

Trabalho De Conclusão De Curso

Correlação entre os níveis salivares e sanguíneos de níquel em indivíduos saudáveis e portadores de carcinoma de células escamosas bucais – estudo piloto

Georgia Voltolini Feller



**Universidade Federal de Santa Catarina
Curso de Graduação em Odontologia**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA**

Georgia Voltolini Feller

**CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SALIVARES E SANGUÍNEOS DE NÍQUEL EM
INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E PORTADORES DE CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS BUCAIS – ESTUDO PILOTO**

Trabalho apresentado à Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a conclusão do Curso de Graduação em Odontologia.

Orientador: Prof^o. Dr. Filipe Ivan Daniel

Co-orientadora: Profa. Dra. Cláudia Regina dos Santos

Florianópolis

2014

Georgia Voltolini Feller

**CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SALIVARES E SANGUÍNEOS DE NÍQUEL EM
INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E PORTADORES DE CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS BUCAIS – ESTUDO PILOTO**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado, adequado para obtenção do título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 13 de novembro de 2014.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Filipe Ivan Daniel
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Rogério de Oliveira Gondak
Universidade Federal de Santa Catarina

Kamile Dutra
Doutoranda em Diagnóstico Bucal

Diogo Capella - Suplente
Doutorando em Diagnóstico Bucal

Dedico este trabalho

Aos meus pais, pelo amor incondicional e esforços sem medidas para me proporcionar todo conforto e apoio necessário nesta etapa, bem como pela transmissão do gosto e disciplina para os estudos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Graciela Voltolini Feller e Gedilson Miguel Feller, pela presença em todos os momentos de dificuldades e angústias, que mesmo sem conhecimentos sobre Odontologia, souberam ouvir e falar tudo o que eu precisava. Agradeço pelo apoio, por acreditarem e investirem em mim, pela fé, pelas orações, pelos cuidados e principalmente, pelo amor que sempre me foi concebido. Agradeço também pela oportunidade de dedicar-me integralmente aos estudos ao longo destes cinco anos. Espero poder retribuir e ser profissionalmente como vocês, que sempre colocaram tanto esforço e dedicação em tudo o que fazem.

Ao meu irmão, Gustavo Voltolini Feller, pela convivência do dia a dia neste último ano de faculdade. Pela paciência, carinho, ajuda que a mim dedicou e principalmente por tornar os dias mais leves com seu bom humor.

Aos meus avós e tias, pelas orações direcionadas ao meu estudo, pela confiança e orgulho depositados em mim.

As minhas amigas e demais colegas de faculdade, pela amizade e força nesta jornada. Em especial a minha amiga e dupla durante todos estes anos, Heloisa Krieger, que compartilhou comigo as dificuldades desta pesquisa. Certamente ninguém entenderá melhor que você o que este trabalho e a conclusão dele representa em nossas vidas.

Ao meu orientador, Professor Dr. Filipe Ivan Daniel, agradeço imensamente pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa sob sua orientação. Agradeço pela sugestão do tema, pelos ensinamentos, pela dedicação, pela paciência e tranquilização que possibilitou o desenvolver e caminhar desta pesquisa. Agradeço também pela seriedade e comprometimento com que conduziu este projeto, que me fez admirar cada vez mais a área da Patologia bucal.

A co-orientadora, Professora Dra. Claudia Regina dos Santos, agradeço pela companhia e ajuda no momento das análises feitas em laboratório, pelas conversas e instruções dadas. Obrigada por também acreditar neste projeto e investir seu tempo e dedicação nele.

O trabalho dignifica o homem.

Max Weber, 1905.

RESUMO

O níquel é um elemento metálico que está naturalmente presente na Terra. É também utilizado nas indústrias, produções e se faz presente na composição dos cigarros. Assim como outros metais, ele é cancerígeno para os seres humanos. O objetivo deste estudo foi determinar a correlação da concentração de níquel na saliva e no sangue dos indivíduos incluídos na amostra da pesquisa. Para tal, foram selecionados 23 pacientes, dentre eles não fumantes, fumantes e portadores de carcinoma de células escamosas bucais (CEC) que estavam sendo atendidos no Ambulatório de Estomatologia do Hospital Universitário da UFSC (HU-UFSC). Os procedimentos de coletas foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do HU-UFSC, sendo a coleta da saliva realizada pelos pesquisadores e a coleta do sangue por um profissional habilitado do próprio laboratório. As amostras foram devidamente armazenadas e transportadas até ao Laboratório de Pesquisas Toxicológicas da UFSC, onde foram posteriormente analisadas segundo o método proposto por Olmedo et al. (2010). Os resultados demonstraram que houve diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) ao se comparar as concentrações de níquel na saliva e no sangue dos indivíduos participantes da pesquisa. Porém, não houve correlação entre os níveis de níquel na saliva e no sangue ao realizar-se o Teste de Spearman ($p \geq 0,05$). Portanto, concluímos que os níveis médios da concentração de níquel na saliva foram maiores que os do sangue e que possivelmente, através da eliminação do metal pela saliva, os níveis sanguíneos de níquel mantiveram-se em valores menores e não prejudiciais.

Palavras-chave: níquel, metal pesado, carcinoma de células escamosas bucais (CEC).

ABSTRACT

Nickel (Ni) is a heavy metal element which is naturally present in the Earth. It is used in industries. Nickel (Ni) is present in the composition of cigarettes. As well as other metals, it is carcinogenic to humans. The aim of this currently study was to determine the correlation of the concentration of Nickel (Ni) in the saliva and blood from individuals included in the survey sample. To this study, were selected 23 patients, including non-smokers, smokers and patients with oral Squamous Cell Carcinoma (SCC) who were being treated at the Clinical University Hospital at Gastroenterology Department in the University Federal of Santa Catarina (UFSC) (HU-UFSC), Brazil. The procedures were performed in the Laboratory of Clinical Analysis of HU-UFSC, and saliva collection held by researchers and the blood was drawn by a qualified professional in the laboratory. The samples were properly stored and transported to the Laboratory of Toxicological Research UFSC which were subsequently analyzed according to the proposed by Olmedo et al. (2010) method. The results demonstrated statistically significant difference ($p \leq 0.05$) when comparing the concentrations of Nickel (Ni) in the saliva and blood in the subjects of the research. However, there was no correlation between the levels of Nickel (Ni) in saliva and blood to hold up the test of Spearman ($p \geq 0,05$). Therefore, we conclude that the average levels of Nickel (Ni) concentration in saliva were higher than those in the blood and possibly by removing metal by saliva, blood levels of Nickel (Ni) remained in lower values and not harmful.

Keywords: Nickel, heavy metal, oral Squamous Cell Carcinoma (SCC).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	37
---------------	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.....34

Quadro 2.....50

Quadro 3.....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.....	41
Tabela 2.....	49
Tabela 3.....	53
Tabela 4.....	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.....	48
Gráfico 2.....	49
Gráfico 3.....	51
Gráfico 4.....	52
Gráfico 5.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ni – Níquel

IARC – Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer

CEC – Carcinoma de Células Escamosas Bucais

As – Arsênio

Cd – Cádmio

Cr – Cromo

Pb – Chumbo

Ni(CO)₄ – Carbonila de Níquel

Ni⁺² – Estado mais frequente de oxidação do níquel

CCP – Câncer de Cabeça e Pescoço

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

Ni₃S₂ – Subsulfeto de Níquel

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

GPT – Glutamic Pyruvate Transaminase

TSP I – Trombospondina

FHIT – Fragile Histidine Triad

UV – Radiação Ultra Violeta

Rpm – Rotação por minuto

AAFG – Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite

DP – Desvio-padrão

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

LISTA DE UNIDADES

µg – Microgramas

mg – Miligramas

kg – Quilogramas

µL – Microlitros

L - Litros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	29
2	REVISÃO DA LITERATURA	31
	2.1 O Elemento Níquel.....	31
	2.2 O Níquel e o tabaco.....	32
	2.3 Efeitos colaterais do Níquel.....	33
	2.4 Efeitos carcinogênicos do Níquel.....	35
	2.4.1 Como ocorre o processo de absorção e distribuição.....	36
	2.4.2 Alterações genéticas.....	38
	2.4.3 Alterações epigenéticas.....	39
	2.4.4 Outras alterações.....	40
	2.5 Dosagem do níquel.....	40
3	OBJETIVOS.....	44
	3.1 Objetivo geral.....	44
	3.2 Objetivo específico.....	44
4	METODOLOGIA	45
	4.1 Delineamento.....	45
	4.2 Aspectos éticos.....	45
	4.3 Amostras.....	45
	4.4 Cadastro e coleta de informações.....	46
	4.5 Coleta de material e armazenamento.....	46
	4.5.1 Coleta e armazenamento de sangue periférico.....	46
	4.5.2 Coleta e armazenamento de saliva.....	46
	4.6 Preparo das amostras.....	47
	4.6.1 Preparo das amostras de sangue.....	47
	4.6.2 Preparo das amostras de saliva.....	47
	4.7 Análise das amostras.....	48
	4.7.1 Otimização e validação do método.....	49
	4.8 Análise Estatística dos Resultados.....	50
5	RESULTADOS.....	51
	5.1 Concentrações de níquel nas amostras de saliva e sangue.....	52
	5.2 Comparação entre os níveis de níquel salivar e sanguíneo.....	54
6	DISCUSSÃO.....	56

7	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
	APÊNDICE A – TCLE.....	76
	APÊNDICE B – CADASTRO DOS PARTICIPANTES	78
	ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	80

1 INTRODUÇÃO

O níquel (Ni) é um elemento metálico que está naturalmente presente na Terra. Ele é encontrado em todo o solo, sendo amplamente utilizado nas indústrias e produções. Os seres humanos são expostos ao níquel, dentre outras formas, através dos alimentos e água ingeridos e do ar inspirado ⁽¹⁾.

Os primeiros estudos a respeito da toxicidade do níquel e seus compostos datam mais de 150 anos ⁽²⁾. Experimentos laboratoriais em animais e estudos observacionais em seres humanos são utilizados para aprimorar nossos conhecimentos a respeito do assunto. Segundo a IARC (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer) este metal já é considerado cancerígeno para os seres humanos ⁽³⁾.

Uma das principais fontes de níquel e outros metais pesados para o corpo humano e para o ambiente é proveniente da utilização do tabaco ⁽⁴⁾. Cerca de 5 milhões de mortes por ano em todo o mundo ainda são causadas pelo uso deste ⁽⁵⁾. Por conseguinte, como níveis de metais nos organismos tendem a aumentar, visto que o hábito de fumar frequentemente persiste por vários anos, o tabagismo pode ser para a população (de fumantes ativos e passivos) uma grande fonte de níquel ⁽⁶⁾.

Quando os seres humanos ficam expostos ao níquel, a sua saúde também fica exposta a uma variedade de efeitos adversos que este pode causar. A dermatite de contato (alergia) é o efeito adverso ou a reação mais comum ⁽⁷⁾. Segundo a literatura, trabalhadores que ficam em maior contato com o níquel podem apresentar dores de estômago, aumento nos níveis de hemácias, bronquite crônica, redução da função pulmonar, câncer de pulmão e da cavidade nasal, bem como diversos outros tipos de câncer, incluindo o câncer bucal ^(1, 8).

O câncer de boca é considerado hoje, o 11º câncer mais frequente nos seres humanos ⁽⁹⁾. Todo ano ocorre um número elevado de novos casos, entre homens e mulheres. Dentre os fatores etiológicos, o tabagismo e etilismo crônico são considerados os mais importantes para o seu desenvolvimento ⁽¹⁰⁾. No entanto, embora menos discutido na literatura, considera-se que a exposição a diversos metais pesados também pode aumentar o risco de desenvolver câncer bucal ^(1, 3).

A associação entre metais pesados, tabagismo e o câncer bucal é dependente da dose, com o risco de desenvolvimento de câncer proporcional ao número de cigarros fumados por dia e a duração do hábito de fumar. No entanto, a exposição humana a ambientes altamente poluídos por níquel, bem como a exposição ao níquel que se dá pelo consumo de

cigarros, tem o potencial de perturbar a homeostase celular e conduzir a uma variedade de patologias e efeitos, incluindo a transformação neoplásica, via ambas as rotas genéticas e epigenéticas ⁽⁷⁾.

Com este trabalho, portanto, deseja-se determinar a correlação da concentração de níquel na saliva e no sangue dos indivíduos incluídos na amostra da pesquisa e se possível, determinar a correlação desses níveis com o diagnóstico de carcinoma de células escamosas bucais (CEC).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O elemento Níquel

O níquel (Ni) é um elemento metálico que está naturalmente presente na Terra. Ele é amplamente utilizado nas indústrias devido às suas propriedades físicas e químicas ⁽¹¹⁾. Puro, é um metal branco-rígido que se combina com outros metais (como ferro, cobre, cromo e zinco) para formar misturas denominadas ligas, o que confirma sua utilidade nas produções. Ele é encontrado naturalmente em todo o solo, podendo ser emitido por vulcões, estando presente em meteoritos e no fundo do oceano em pedaços de minerais. É também liberado para a atmosfera através da mineração, ligas, compostos ou indústrias que fazem uso do níquel, por usinas que queimam carvão e incineradores de lixo ⁽¹⁾.

Assim como outros metais pesados tais como o arsênio (As), cádmio (Cd), cromo (Cr) e chumbo (Pb), o níquel é também classificado segundo a IARC (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer) como um metal cancerígeno para os seres humanos ⁽³⁾. Estes, por não serem metais biodegradáveis, irão permanecer em nossos organismos por muito tempo, podendo gerar alterações nas funções exercidas pelas células ⁽¹²⁾.

O níquel é um metal conhecido por ser essencial para algumas espécies, mas ainda não foi provado ser essencial para a saúde dos seres humanos ⁽¹³⁾, ou seja, não existem enzimas humanas ou co-fatores dependentes de níquel para o seu funcionamento normal ⁽¹¹⁾. Em contraste, alguns autores acreditam que o níquel desempenha um papel em processos fisiológicos, agindo como um co-fator na absorção de ferro no intestino ⁽¹⁴⁾. Apesar das dúvidas quanto à sua essencialidade, os seres humanos são expostos ao níquel de diversas formas, uma delas é através da sua dieta. Cerca de 170µg de níquel são ingeridos diariamente pelos seres humanos através da sua alimentação. Alimentos ricos em níquel incluem amendoim, nozes, soja, lentilhas, legumes, peixes, mariscos, ervilhas, cacau, aveia e chocolate ao leite ^{(1), (15), (16)}. Já através do consumo de água, os seres humanos ingerem cerca de 2µg de níquel por dia ⁽¹⁾. Entretanto, quando este metal é ingerido em grandes quantidades, torna-se tóxico para os organismos vivos ⁽¹⁷⁾.

Além da exposição ao níquel através da alimentação, os seres humanos entram em contato com este metal pesado por ele estar naturalmente nos solos, nas águas, nas plantas e animais ⁽¹³⁾. Porém, por ser utilizado muitas vezes em processos industriais, resíduos líquidos de níquel são lançados sem qualquer tratamento prévio no meio ambiente ⁽¹⁸⁾,

contaminando diversos locais. Por conseguinte, as pessoas entram em contato com grandes quantidades deste metal, tornando-o novamente prejudicial a suas saúdes ⁽¹⁾.

O níquel ainda reveste algumas jóias, moedas e utensílios de aço inoxidável, é utilizado para dar coloração às cerâmicas e na produção de pilhas e até mesmo uma criança recém-nascida já fica exposta ao níquel ao entrar em contato com o sangue da própria mãe ⁽¹⁾. Por conseguinte, é um metal com o qual os seres humanos entram em contato de diversas maneiras no seu dia a dia ⁽¹⁾.

Quanto aos seus sinônimos e nomes comerciais, os compostos inorgânicos incluem: níquel metálico, níquel elementar, óxido de níquel, cloreto de níquel, subsulfeto de níquel, hidróxido de níquel e sulfato de níquel. O único composto orgânico do metal é a carbonila de níquel (Ni(CO)_4) ⁽²⁾.

Quanto as suas características, os principais compostos inorgânicos de níquel podem ser divididos em solúveis (como os hidróxidos, sulfatos, cloretos e nitratos) e insolúveis (óxidos, sulfetos, subsulfeto de níquel, etc). O estado de oxidação mais frequente deste metal é o Ni^{+2} ⁽¹⁹⁾.

2.2 O níquel e o tabaco

Uma das principais fontes de metais pesados (incluindo o níquel) para o corpo humano e para o ambiente é proveniente da utilização do tabaco ⁽⁴⁾. Cerca de 5 milhões de mortes por ano em todo o mundo (1 em cada 10 mortes) são causadas pelo uso do tabaco ⁽⁵⁾ e estima-se que até 2030, este número suba para 10 milhões (5 a cada 10 mortes) ⁽²⁰⁾. No Brasil, o jeito mais comum de se utilizar o tabaco é o fumo na forma convencional. Porém, o tabaco também pode ser utilizado de outras maneiras, o que é mais comum em outras regiões, como na forma de fumo invertido ou na forma mascada ⁽¹⁰⁾.

A planta do tabaco tem uma capacidade natural de acumular grandes quantidades de minerais a partir do solo contaminado ⁽⁶⁾, mas a quantidade de metais pesados depositada no organismo humano durante a inalação da fumaça do cigarro depende de fatores como a quantidade de metal presente no tabaco, os percentuais absorvidos pelos pulmões e também da porcentagem do metal que é transferida para a fumaça durante a queima do cigarro ⁽²¹⁾.

A composição dos cigarros e de sua fumaça inclui mais de 7.000 substâncias ⁽²²⁾ como aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos aromáticos, metais pesados, dentre outros ⁽²³⁾. Estes

componentes do cigarro são os responsáveis, através da sua absorção ativa e passiva no trato respiratório, pelos danos à homeostasia do organismo ⁽²³⁾.

A quantidade de níquel inalada que atinge os pulmões e entra na corrente sanguínea depende também do tamanho das partículas do metal. Se estas são grandes, elas ficam retidas no nariz, mas se as partículas são pequenas, elas podem chegar até os pulmões e ali permanecer por um longo período de tempo. O níquel também pode ir para outros órgãos, sendo que seu principal destino são os rins. Posteriormente, ele é excretado pela urina, pelas fezes e em menor quantidade pelos cabelos ⁽²⁴⁾, pele, suor e saliva ⁽¹⁾.

Como níveis de metais no nosso corpo tendem a aumentar, visto que o hábito de fumar frequentemente persiste por vários anos, o tabagismo pode ser para a população fumante (ativa e passiva) uma grande fonte de metais pesados, dentre eles o níquel. Ainda não existem estudos sugerindo valores limites para essas substâncias nos cigarros, mas existem níveis considerados aceitáveis para os seres humanos, visto que os metais estão presentes também em outros locais, como na dieta, produtos naturais e são onipresentes no ambiente ⁽⁶⁾.

2.3 Efeitos colaterais do níquel

Quando os seres humanos ficam expostos ao níquel, a sua saúde também fica exposta a uma variedade de efeitos adversos que este pode causar. A dermatite de contato (alergia) é o efeito adverso ou a reação mais comum ^(7, 8). Cerca de 10 a 20% da população têm sensibilidade ao níquel. Essa sensibilidade pode ser, por exemplo, decorrente do uso de alguma joia ou alguma outra peça que contenha níquel que fique em contato direto e prolongado com a pele, causando erupções cutâneas na mesma região ⁽¹⁾.

Os indivíduos mais expostos ao níquel são aqueles que se expõem ocupacionalmente a ele ⁽¹⁾, ou seja, são os trabalhadores de indústrias de mineração, refinis, produção de ligas, soldas, dentre outras; que acabam inalando ou tendo contato do metal com suas peles ⁽⁷⁾.

Outros efeitos colaterais do níquel podem ser decorrentes da inalação dos seus compostos. Por exemplo, a inalação acidental de carbonila de níquel pode provocar sintomas como: dor de cabeça, vertigens, náuseas, vômitos, insônia e irritabilidade, que geralmente duram algumas horas. Em seguida, podem aparecer sintomas como: aperto no peito, tosse, dispneia, cianose, taquicardia, palpitações, sudorese, distúrbios visuais, vertigem e fraqueza ⁽⁸⁾.

Alguns trabalhadores que ficam em contato com o níquel podem apresentar asma, mas esta é uma reação mais rara. Dores de estômago e aumento nos níveis de hemácias foram vivenciadas por trabalhadores que ingeriram água que continha altas taxas de níquel ^(1, 25). Trabalhadores de uma galvanoplastia que beberam água contaminada com cloreto de níquel e sulfato de níquel também apresentaram reações adversas, como: náuseas, vômitos, dor abdominal, diarreia, dor de cabeça, tosse, falta de ar e tontura. Esses sinais e sintomas duraram até 2 dias, mas todos os trabalhadores recuperaram-se depois ⁽²⁵⁾. Porém, os efeitos mais prejudiciais à saúde ainda são os do trato respiratório, como a bronquite crônica, a redução da função pulmonar, o câncer de pulmão e da cavidade nasal, bem como diversos outros tipos de câncer ⁽¹⁾.

O Quadro 1 lista os principais efeitos colaterais da exposição ao níquel, bem como os possíveis cânceres causados por este metal.

Quadro 1 – Efeitos colaterais à exposição ao níquel.

Alterações dermatológicas	Dermatites de contato (alergias) ^(7, 8, 26)
Alterações gerais	Intoxicação aguda: dor de cabeça, vertigens, náuseas, vômitos, insônia, irritabilidade ⁽⁸⁾
Alterações gástricas	Dores de estômago ^(1, 25)
Alterações respiratórias	Tosse, dispneia, asma, bronquite, rinite, sinusite, redução da função pulmonar ^(1, 8)
Alterações cardiovasculares	Doenças cardiovasculares, palpitações, taquicardia ^(1, 8)
Alterações renais	Doenças renais ^(1, 27)
Cânceres	Pulmão, cavidade oral, nasal, laringe, orofaringe, hipofaringe, esôfago, estômago, fígado, pâncreas, bexiga, ureter, rim, útero e leucemia ^(1, 8)

Desde 1933 começaram os relatos a respeito da propensão que os trabalhadores que lidam com níquel têm de desenvolver câncer na cavidade nasal e no pulmão ⁽⁷⁾. A partir dali a carcinogenicidade do níquel foi comprovada por diversos estudos epidemiológicos em seres humanos e animais ⁽¹¹⁾.

Em um estudo realizado por Sunderman et al. (1989) ⁽²⁸⁾ tumores do trato respiratório de trabalhadores de uma refinaria de níquel foram analisados, constatando-se que dos 100 carcinomas nasossinusais investigados, 48% eram de células escamosas, 39% eram carcinomas indiferenciados e anaplásicos, 6% adenocarcinomas, 3% carcinomas de células de

transição e 4% eram de outros tumores malignos. Já na análise dos cânceres de pulmão, dos 259 analisados, 67% foram diagnosticados como carcinoma de células escamosas. Sendo assim, este estudo sugere uma relação entre a presença de carcinomas de células escamosas com a inalação de níquel ⁽²⁹⁾.

O aumento no risco de desenvolver outros tumores malignos, como carcinomas da laringe, rins, próstata, estômago e sarcomas de tecidos moles ocasionalmente é observado, mas a significância estatística destes resultados ainda é duvidosa ⁽⁷⁾.

Especificamente os produtos do tabaco (como o níquel) são associados a uma variedade de tipos de câncer. Tanto o fumo (cigarros, charutos e cachimbos) e o fumo "sem fumaça" (rapé e tabaco de mascar) têm levado ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer oral ⁽³⁰⁾ e de outros tipos de cânceres ⁽³¹⁾.

Pesquisas anteriores demonstraram que o tabagismo pode aumentar os níveis de metais pesados em nosso corpo ^(32, 33). Levando isto em consideração, em 2013, um estudo na Tunísia foi realizado para verificar se havia ou não associação entre a exposição a metais pesados (como níquel e cromo), com o desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço (CCP). Os pesquisadores avaliaram as concentrações destes metais no sangue de pacientes com CCP e grupo controle, concluindo que nos pacientes com CCP os níveis sanguíneos de cromo e níquel foram significativamente maiores do que no grupo controle (1,4 e 3,6 vezes, respectivamente) ⁽³⁴⁾. Este resultado está de acordo com outro estudo caso-controle realizado em Taiwan, que revelou uma associação significativa entre elevados níveis de cromo e níquel no sangue com a prevalência de câncer bucal. Neste último, o nível de cromo da amostra de sangue dos pacientes com câncer bucal foi 1,4 vezes maior do que do grupo controle e o nível de níquel foi 1,6 vezes maior. Por fim, concluíram que entre os metais estudados que causavam preocupação devido aos seus altos teores no solo da região, cromo e níquel são os que podem desempenhar um papel significativo no desenvolvimento do câncer bucal ⁽²¹⁾.

2.4 Efeitos carcinogênicos do níquel

Os mecanismos pelos quais o níquel promove a carcinogênese ainda não são totalmente conhecidos, porém, o assunto tem sido alvo de diversas investigações epidemiológicas e experimentais. Sabe-se, no entanto, que estes mecanismos envolvem alterações genéticas e epigenéticas ⁽⁷⁾, tendo este metal um elevado potencial de transformação celular ⁽³⁵⁾.

A extensão dos danos e a sua gravidade depende dentre outras coisas, da dose de níquel que o indivíduo entra em contato. Portanto, doses elevadas de níquel são mais eficazes na produção de efeitos genotóxicos e doses mais baixas provavelmente provocam alterações epigenéticas em células-alvo para transformações neoplásicas ^(36, 37).

2.4.1 Como ocorre o processo de absorção e distribuição do níquel

Os diferentes compostos de níquel possuem também diferenças quanto a sua atividade cancerígena, pois refletem diferentes modos na absorção, transporte, distribuição, retenção e capacidade de entrega desses íons para as células que acabam sendo alvo. Portanto, é relevante considerar a solubilidade, estrutura e tamanho das partículas em questão, bem como a atividade redox dos derivados de níquel para saber os efeitos tóxicos e cancerígenos deste metal ⁽⁷⁾.

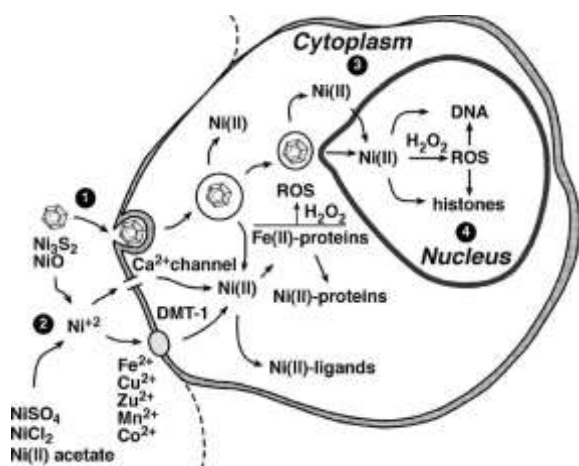
Estudos farmacocinéticos em humanos indicam que o níquel é absorvido através dos pulmões ⁽³⁸⁾, do trato gastrointestinal ⁽³⁹⁻⁴¹⁾ e da pele ⁽⁴²⁾. Apesar de o níquel ser um metal fracamente absorvido pela via dérmica, alguns compostos como o cloreto de níquel e o sulfato de níquel podem penetrar na pele resultando numa absorção de até 77% em 24 horas ⁽⁴³⁾. A absorção de níquel através da exposição oral varia de 3 a 40%, dependendo do tipo de composto de níquel que estava na água ou nos alimentos. Já quando o níquel é inalado, cerca de 20 a 35% do metal que fica retido nos pulmões é absorvido no sangue ⁽³⁹⁾.

A absorção do níquel varia conforme a solubilidade. No caso das partículas solúveis (como o sulfato de níquel, cloreto de níquel e acetato de níquel), elas são transportadas para dentro da célula por transporte ativo ⁽¹⁹⁾. No entanto, essa forma de captação de níquel solúvel pelas células parece ser relativamente ineficiente e leva a uma baixa atividade carcinogênica ⁽⁷⁾. Já no caso das partículas insolúveis de níquel, o mecanismo mais eficaz de captação celular se dá através da fagocitose ⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾. As partículas de níquel insolúvel (por exemplo, óxido de níquel, subsulfeto de níquel e as partículas de pó) entram na célula através da fagocitose e então, pela ação de vesículas fagocíticas são liberadas no citoplasma e no núcleo. O níquel no citoplasma é capaz de promover diferentes ligações com aminoácidos, peptídeos, proteínas e outros; alguns dos quais causam estresse hipóxico devido à interferência no transporte de ferro e hidroxilases que são dependentes deste. Enquanto o níquel presente no núcleo interage com o DNA, causando danos mutagênicos ao DNA das células (agravado pela inibição do funcionamento das enzimas que reparam o DNA) ⁽⁷⁾.

A carga de superfície das partículas também influencia na fagocitose e na consequente absorção de níquel ⁽⁵⁰⁾. Partículas que têm uma carga superficial negativa são fagocitadas, enquanto as que possuem uma carga positiva, não são tão facilmente. Após a fagocitose, as partículas ficam contidas em vacúolos que se tornam altamente acidificados, aumentando significativamente a dissolução do níquel e os níveis intracelulares desse metal ⁽⁵¹⁾.

O esquema referente à absorção de níquel esta representado na Figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática da absorção de níquel e suas principais interações celulares.



Fonte – Kasprzak, K. S et al., 2003 ⁽⁷⁾.

Estudos sobre a distribuição de níquel no organismo mostram que os compostos solúveis absorvidos não se concentram marcadamente em nenhum órgão, embora algumas concentrações elevadas encontrem-se no esqueleto, fígado e rim. O pulmão é o órgão de acúmulo para exposições a longo prazo e parece que o armazenamento do níquel se dá nas mitocôndrias ⁽⁴⁷⁾.

O níquel também é conhecido por se ligar a proteínas específicas e/ou aminoácidos do soro sanguíneo e da placenta. Estes ligantes são fundamentais para o seu transporte e distribuição no corpo ⁽⁸⁾.

O sexo da pessoa parece não interferir na distribuição do níquel. Entretanto, estudos em tecidos humanos revelaram uma associação significativa entre a idade e o aumento dos níveis de níquel nos tecidos, refletindo o acúmulo deste metal devido à exposição a fontes ambientais ao longo do tempo ⁽⁴⁸⁾. Além disto, os parâmetros tais como o composto de níquel administrado, a dose, o número de administrações, o período de tempo entre a exposição e a análise e a via de absorção podem influenciar fortemente no padrão de distribuição dos órgãos ⁽⁴⁹⁾.

2.4.2 Alterações genéticas

Alguns autores dizem que os efeitos carcinogênicos do níquel podem resultar da atividade de redox deste com certos ligantes celulares (incluindo aminoácidos, peptídeos, proteínas e outras moléculas), mas que não há ligação do níquel com o DNA, ou seja, que ele não gera efeitos genotóxicos ⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾. Em contraste, tanto *in vitro* como *in vivo* observou-se que o níquel produz algumas anomalias genéticas, como: quebra da fita do DNA, ligações cruzadas do DNA-proteína (*cross-links*), mutações em um único gene, troca entre cromátides irmãs, micronúcleos, excisão de nucleotídeos, alteração na concentração de ácidos nucleicos e transformações celulares ^{(19) (50) (51)}.

Diversos experimentos são realizados para estudar as alterações genéticas que o níquel pode causar nas células. Um deles explica que o níquel pode causar danos às bases do DNA e danos aos cromossomos ⁽⁵²⁾. Outro diz respeito a um estudo feito em cultura com células de câncer de pulmão, onde se verificou que o níquel solúvel induziu mutações nas áreas de repetição C-G do DNA, através tanto da contração, como da expansão dessas áreas ⁽⁵³⁾.

Íons de níquel foram encontrados formando radicais de oxigênio e aumentando a oxidação celular, catalisando a formação de ligações cruzadas covalentes de proteínas e aminoácidos com o DNA ^{(54) (52)}. Estas ligações cruzadas são importantes no processo da carcinogênese do níquel, pois representam uma lesão que não é facilmente reparada ⁽⁵⁰⁾.

Experimentalmente, células cultivadas em níquel solúvel ou em Ni₃S₂ (subsulfeto de níquel insolúvel) mostraram predominantemente mutações por deleção geradas através de vários mecanismos genotóxicos ⁽⁵⁵⁾. A mutação por transversão G→T, típica para lesões oxidativas do DNA, foi encontrada no gene K-ras (códon 12) em tumores renais induzidos pelo Ni₃S₂ sozinho ou combinado com pó de ferro ⁽⁵⁶⁾.

No caso do gene p53, foram encontradas mutações nesse gene em células expostas ao níquel, em tumores de pulmão ⁽⁵⁷⁾. Esse gene é um supressor de tumores e está envolvido na regulação da proliferação celular e da apoptose. Portanto, mutações nele geram falhas na sua função e consequentemente facilitam o desenvolvimento de tumores ⁽⁵¹⁾. No entanto, em outros estudos ainda existem dúvidas quanto à mutação nesse gene ser essencial para a transformação neoplásica induzida por níquel ⁽⁵²⁾.

Rossetto et al. (1994) ⁽⁵⁵⁾, aborda uma hipótese interessante sobre duas vias distintas envolvidas no mecanismo de mutagenicidade do níquel. Uma das vias envolve a entrega de níquel solúvel diretamente para o núcleo, sendo este o agente mutagênico que age

já sobre o DNA; e a segunda via envolve a acumulação de compostos de níquel solúveis que, subsequentemente, interagem com outras moléculas (como proteínas e lipídeos) para produzir moléculas secundárias que podem então interagir com o DNA, induzindo mutações.

Avanços mais recentes na compreensão da atividade redox do níquel sugerem mecanismos que envolvem espécies reativas de oxigênio como participantes na sua atividade mutagênica ⁽⁵²⁾. A geração dessas mutações pode ocorrer a partir da interação direta do níquel com o DNA na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ⁽⁵⁸⁾. Em um estudo *in vitro* isso foi demonstrado, ou seja, na presença de H_2O_2 , o níquel aumentou a oxidação de proteínas celulares. Este aumento de oxidantes pode ser responsável por uma variedade de efeitos intracelulares. Um desses efeitos é a ligação covalente de certos aminoácidos, tais como histidina, cisteína, e tirosina ao DNA ⁽⁵⁰⁾. Além disto, a peroxidação de lipídeos é também documentada por resultar em subprodutos prejudiciais ou mutagênicos ao DNA ⁽⁵⁹⁾.

2.4.3 Alterações epigenéticas

A exposição das células aos compostos de níquel induz mudanças na expressão gênica que leva a padrões de expressão característicos de células cancerosas. Existem alguns estudos a respeito destas alterações e das consequências que o níquel é capaz de causar nas células. Um desses estudos refere-se a sua capacidade de induzir a hipermetilação do gene GPT (*Glutamic Pyruvate Transaminase*). Os mecanismos dessa indução ainda são desconhecidos ⁽⁶⁰⁾, mas é provável que a inativação de um gene supressor de tumor por hipermetilação possa auxiliar na transformação celular carcinogênica ⁽⁶¹⁾.

Outro estudo diz respeito ao fator de transcrição ATF-1, que na presença do níquel atuou como um regulador negativo para a TSP I (trombospondina) que é um potente supressor da angiogênese, estimulando assim, o crescimento de tumores ^(62, 63).

Para o gene FHIT (*Fragile Histidine Triad*), que é um gene supressor de tumores que fica localizado em uma região cromossômica frágil e sensível a alterações, o níquel agia inibindo a ação de sua proteína já traduzida ou inibindo a formação da mesma, que tinha por função, induzir a apoptose das células tumorais ⁽⁶⁴⁾. Portanto, a diminuição da expressão do gene FHIT, pela inibição da formação da proteína, coincidiu com desenvolvimento mais rápido dos tumores. Em geral, o declínio do FHIT em células ou tecidos transformados, juntamente com a inibição da sua atividade enzimática, pode indicar a possível contribuição destes dois efeitos para os mecanismos de carcinogênese do níquel ⁽⁶⁵⁾.

In vitro, o níquel e alguns outros metais pesados foram encontrados causando prejuízo à função da enzima DNA polimerase e, por conseguinte, ocorrendo a incorporação errada dos nucleotídeos ⁽⁶⁶⁾. Além disto, o níquel juntamente com outros metais carcinogênicos age como um potente inibidor dos mecanismos de reparação das bases do DNA, aumentando os danos causados pela radiação ultravioleta (UV), pelas espécies de oxigênio reativas, pelo benzo(a)pireno e pelos agentes de metilação ⁽⁶⁷⁻⁷⁰⁾.

2.4.4 Outras alterações

Outra forma do níquel demonstrar seu potencial para auxiliar na indução e crescimento de tumores se dá através do sistema imunológico. Com a ativação da resposta inflamatória, na presença do níquel, ocorre um aumento no estresse oxidativo e danos à célula e ao DNA ⁽⁷¹⁾. Ao mesmo tempo, o níquel promove a inibição das células *natural killer*, podendo assim, suprimir o reconhecimento e a eliminação de células neoplásicas, contribuindo para indução e crescimento do tumor ⁽⁷²⁾.

2.5 Dosagem do níquel

Nos seres humanos ocorrem muitas variações nos níveis de níquel. Para dosagens e comparações muitos itens devem ser levados em consideração, como por exemplo, a origem geográfica do indivíduo em questão, a sua alimentação, os seus hábitos quanto à exposição ao cigarro, o método analítico empregado para análise, dentre outros ⁽⁴⁹⁾.

Levando em consideração a prevenção dos efeitos adversos à saúde que os metais pesados e outras substâncias nocivas podem causar, há uma crescente preocupação em monitorar a toxicidade desses metais e também em avaliar o risco que eles podem causar, para que então limites ocupacionais e ambientais sejam estabelecidos ⁽⁷³⁾.

Para analisar a dosagem de níquel e de outros metais pesados no corpo humano, existem alguns substratos. Amostras de sangue e urina são os mais aceitos e utilizados para este biomonitoramento ⁽⁷⁴⁾. Porém, o níquel também pode ser encontrado em diferentes quantidades no suor e na saliva ⁽⁷⁵⁾. Além dos anteriores, o cabelo humano já se apresenta como uma alternativa, por ser uma fonte de excreção para substâncias como os metais pesados ⁽⁷⁶⁾.

Os metais tóxicos encontram-se presentes na saliva e isto já é reconhecido por diversos autores ⁽⁷⁷⁻⁷⁹⁾. Por exemplo, após a inserção de aparelho ortodôntico há alguns relatos de aumento na concentração salivar de metais como níquel e cromo ^(80, 81). No caso do estudo desenvolvido por Kocadereli et al. (2000) ⁽⁸⁰⁾, os aparelhos ortodônticos fixos não afetaram significativamente as concentrações salivares de níquel e cromo durante os primeiros 2 meses de tratamento. Porém, o fluxo contínuo de saliva na boca e o curto período de amostragem podem ter sido insuficientes para a detecção desses metais ⁽⁸⁰⁾.

A composição da saliva pode ser afetada por muitas variáveis fisiológicas, como a hora do dia, as condições de saúde, a dieta e fluxo salivar de cada pessoa ⁽⁸²⁾. Portanto, a análise das quantidades de metais a partir da saliva *in vivo* parece ser insuficiente para diferenciar os níveis de níquel salivar em pacientes com e sem aparelho ortodôntico, visto que as variações nos níveis desse metal são dependentes de tantos fatores ⁽⁸⁰⁾.

Os níveis de níquel em fluidos biológicos, cabelo e alguns outros materiais, crescem conforme o aumento da exposição ocupacional ou ambiental, diminuindo rapidamente quando essa exposição é reduzida ou interrompida ⁽⁴⁹⁾. Os dados para os valores normais de níquel na urina, sangue, saliva e soro publicados nas últimas três décadas, variam muito, sendo que os valores de referência em amostras de pessoas saudáveis, não expostas ao níquel (de forma ocupacional ou ambiental) estão listados na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentrações normais de níquel em amostras de adultos saudáveis não expostos.

Amostra	Nº m/f*	[]Ni* Média ± DP*	Unidade	Referências
Sangue	15/15	0.34 ± 0.28	µg/litro	Linden et al (1985) ⁽⁸³⁾
Soro	22/22	0.2 ± 0.2	µg/litro	Hopfer et al. (1989) ⁽⁸⁴⁾
Urina	18/16	2.0 ± 1.6 2.8 ± 1.9	µg/litro	Sunderman et al. (1986) ⁽⁸⁵⁾
Suor	6/8	51 ± 38	µg/litro	Christensen et al.(1979) ⁽⁸⁶⁾
Saliva	32/6	1.9 ± 1.0	µg/litro	Catalanatto et al. (1977) ⁽⁸⁷⁾
Cabelo	15/7	0.22 ± 0.08	mg/kg	Nechay e Sunderman (1973) ⁽⁸⁸⁾

*m/f = masculino/feminino; *[]Ni = concentração de níquel; *DP = Desvio Padrão.
Fonte – Adaptado de Hertel et al. (1991) ⁽⁴⁹⁾.

Outros valores de referência encontrados na literatura para o níquel em adultos saudáveis foram: 0,2 mg/litro no soro e 1-3 µg/litro na urina ⁽⁴³⁾.

Grandjean et al. (1980) ⁽⁸⁹⁾ relataram que análises de concentrações de níquel em ambas as amostras de urina e plasma devem ser obtidas para avaliar a exposição do trabalhador ao níquel. Eles encontraram níveis significativamente mais elevados de níquel no plasma e na urina de pintores e níveis mais baixos em soldadores, em comparação com outros trabalhadores. Essas diferenças provavelmente refletem as diferentes características de toxicocinética dos compostos de níquel a que os trabalhadores foram expostos.

Torjussen & Andersen (1979) ⁽⁹⁰⁾ analisaram amostras de biópsias da mucosa nasal de 318 pessoas que trabalhavam em contato com níquel, sendo que 15 trabalhadores eram aposentados e 57 eram do grupo controle, não expostos. Os resultados mostraram que a exposição ao níquel se elevou significativamente nas concentrações da mucosa nasal em ambos os trabalhadores ativos e aposentados ($2,74 \pm 4,12$ mg/kg e $1,14 \pm 1,78$ mg/kg, respectivamente), contra $0,13 \pm 0,2$ mg/kg nos controles. A concentração média de níquel na mucosa nasal foi maior em trabalhadores expostos a uma concentração de níquel mais alta na atmosfera do trabalho. Já os trabalhadores expostos a aerossóis de componentes solúveis de níquel, com uma concentração de níquel atmosférica menor, apresentaram as maiores concentrações de níquel no plasma e na urina, e as menores na mucosa nasal. Além disto, a concentração na mucosa foi significativamente correlacionada com a duração da exposição ao níquel.

As concentrações de metais pesados no cabelo podem ser até 10 vezes mais elevadas do que nos níveis encontrados em amostras de sangue ou de urina. Por outro lado, enquanto o sangue, a saliva e a urina refletem claramente uma exposição recente dos metais, o cabelo reflete uma exposição passada, principalmente pela contaminação ambiental e ocupacional, que pode ser proporcionada por uma média do período de crescimento dos cabelos ⁽⁷³⁾. Entretanto, apesar da análise de metais pesados através dos cabelos ser uma forma não invasiva de medição, o índice de exposição interna é controverso, por causa das diferentes exposições externas às quais os cabelos estão sujeitos e dos diferentes métodos de amostragem e de limpeza que ainda não são padronizados ⁽⁴⁹⁾.

Atualmente utiliza-se a saliva para medir os níveis de metais pesados nos organismos. Embora a determinação destes na saliva ainda seja considerada apenas como uma alternativa às amostras de sangue e de urina, a saliva parece apresentar vantagens práticas para monitorar a exposição ocupacional ao níquel e outros metais ⁽⁷³⁾.

Conclui-se por fim, que o níquel é um elemento que ocorre em baixas concentrações em todos os tecidos e fluidos que já foram examinados, principalmente nos indivíduos não expostos ⁽⁹¹⁾. Porém, a sua concentração pode variar nos fluidos corporais conforme a exposição a qual o indivíduo fica exposto, com as concentrações aumentando conforme o aumento dessa exposição ⁽⁴⁹⁾.

Dentre as técnicas mais sensíveis empregadas na determinação analítica de níquel, destaca-se a espectrometria de absorção atômica, tanto a modalidade que utiliza como atomizador o forno de grafite, quanto a que usa a chama ⁽²⁾. O uso desta técnica permite a análise de metais em amostras biológicas sem qualquer separação do metal a partir da sua matriz biológica e não há necessidade de procedimentos de extração para analisar os elementos. Especificamente com a saliva, a mera diluição das amostras é o suficiente para minimizar a interferência e os efeitos da matriz biológica, tais como proteínas, sais e outros ⁽⁸⁰⁾.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Determinar a correlação da concentração de níquel na saliva e no sangue dos indivíduos incluídos na amostra da pesquisa.

3.2 Objetivo Específico

- Determinar, por meio de espectrometria de absorção atômica, a concentração do níquel nas amostras de saliva e de sangue periférico e correlacionar as concentrações obtidas entre si.

4 METODOLOGIA

Para o desenvolvimento desta pesquisa a metodologia foi dividida em duas etapas: uma ambulatorial e outra laboratorial, as quais serão detalhadas a seguir.

4.1 Delineamento

Trata-se de um estudo descritivo observacional.

4.2 Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, sendo aprovado sob o número 467.387 (Anexo A).

Todos os pacientes foram informados pelos pesquisadores quanto à realização desse estudo e seus objetivos. Após ler e compreender os procedimentos do estudo, os que concordaram em participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

4.3 Participantes

As amostras de saliva e sangue foram coletadas de pacientes atendidos no Ambulatório de Estomatologia do Hospital Universitário da UFSC (HU-UFSC), no período de novembro de 2013 a julho de 2014.

Foram excluídos da amostra os pacientes com evidência de exposição a metais pesados provenientes de outras fontes.

4.4 Cadastro e coleta de informações

Os pacientes foram abordados, entrevistados e examinados no Ambulatório de Estomatologia do HU-UFSC. Após esclarecimentos básicos sobre a pesquisa a ser desenvolvida, os voluntários que concordaram com a sua participação e assinaram o TCLE foram submetidos a um cadastro (Apêndice B) e coleta de material.

Este cadastro incluiu informações como dados pessoais, diagnóstico histopatológico, tratamentos já realizados, história médica pregressa, medicamentos em uso, hábitos de tabagismo e etilismo, etc. Todos os dados fornecidos durante a entrevista foram estritamente confidenciais e utilizados apenas para o desenvolvimento da pesquisa e publicação dos resultados.

4.5 Coleta das amostras de sangue e saliva e armazenamento das mesmas

4.5.1 Coleta e armazenamento de sangue periférico

As coletas ocorreram no Laboratório de Análises Clínicas do HU-UFSC e foram realizadas por um profissional habilitado do próprio laboratório. 4mL de sangue periférico foram coletados e armazenados em tubos que continham EDTA, sendo mantidos em um recipiente com gelo até serem transportados ao Laboratório de Pesquisas Toxicológicas da UFSC, onde foram armazenados a 4°C até a análise.

4.5.2 Coleta e armazenamento de saliva

A saliva total foi coletada, baseada no protocolo utilizado por Koseki et al. (2004)⁽⁹²⁾ e na metodologia de Navazesh (1993 e 2008)^{(93), (94)}, imediatamente após a coleta do sangue. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas do HU-UFSC.

As seguintes orientações foram dadas aos pacientes previamente à coleta:

- Não ingerir ou colocar na boca qualquer substância durante o período de 1 hora antes da coleta. Atividades como escovar os dentes, alimentar-se, fumar, ingerir líquidos deveriam ser suspensas durante este tempo;

- Não aplicar nos lábios fármacos ou produtos cosméticos (batom, protetor solar, cremes, manteiga de cacau, etc.);
- Enxaguar a boca com água destilada antes da coleta. Aguardar o período de 5 minutos e eliminar toda a saliva presente na boca até este momento, através da deglutição;
- Durante a coleta, manter-se sentado e com os olhos abertos;
- Não tocar diretamente no interior do recipiente de coleta;
- Conforme for ocorrendo o acúmulo de saliva na boca, depositá-la no frasco de coleta, pelo tempo de 5 minutos.

Para a coleta, o paciente depositou toda a saliva em um recipiente previamente esterilizado, até alcançar o valor mínimo de 1mL. Após isto, a saliva foi armazenada em um recipiente contendo gelo e transportada ao Laboratório de Pesquisas Toxicológicas da UFSC, onde foi armazenada a -20°C.

4.6 Preparo das amostras de sangue e saliva

4.6.1 Preparo das amostras de sangue

As amostras de sangue foram previamente retiradas da geladeira e após atingirem a temperatura ambiente, foram homogeneizadas. Em seguida, 500µL de sangue foram adicionados em *vials* e diluídos na proporção 1:4 na solução de ácido nítrico 0,2% e Triton X-100 0,1%.

4.6.2 Preparo das amostras de saliva

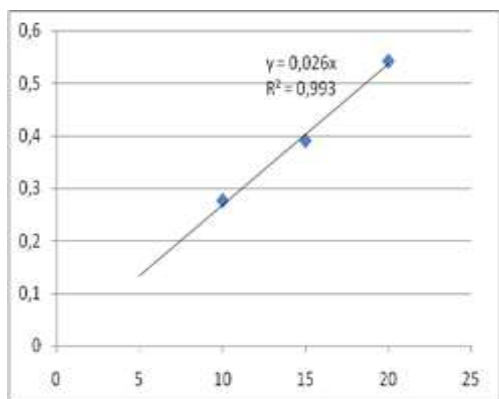
As amostras de saliva foram descongeladas a temperatura ambiente, identificadas e transferidas para tubos do tipo Falcon para serem, sequencialmente, centrifugadas a 1.500rpm por 5 minutos a 25°C. A centrífuga utilizada foi da marca Jouan, modelo BR4i (Jouan, França). Após isto, utilizando micropipetas, o sobrenadante foi transferido para microtubos do tipo Eppendorf. Em seguida, 500µL de saliva foram adicionados em *vials* e

diluídos na proporção 1:2 na solução diluente composta por ácido nítrico 0,2% e Triton X-100 0,1%.

4.7 Análise das amostras de sangue e saliva

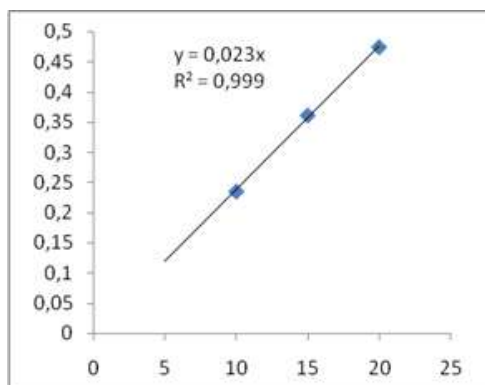
As análises do sangue e saliva foram realizadas no Laboratório de Pesquisas Toxicológicas da UFSC, por meio de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (AAFG). O espectrômetro utilizado é da marca ThermoScientific, modelo Ice3000 (Reino Unido). Os procedimentos foram baseados segundo o protocolo determinado por Olmedo et al. (2010) ⁽⁷³⁾. Curvas de calibração foram realizadas com diferentes concentrações de níquel (5, 10, 15 e 20 µg/L) para o sangue e para a saliva, demonstradas nos gráficos 1 e 2, respectivamente. Para o preparo dos pontos de calibração, bem como das amostras, as mesmas foram diluídas com uma solução diluente composta por ácido nítrico 0,2% e Triton X-100 0,1%. Dihidrogenofosfato de amônio foi utilizado como modificador de matriz.

Gráfico 1 – Curva de Calibração com diferentes concentrações de níquel (5, 10, 15 e 20 µg/L) conforme a absorbância (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 AU) para as amostras de sangue.



Fonte: Dados da pesquisa.

Gráfico 2 – Curva de Calibração com diferentes concentrações de níquel (5, 10, 15 e 20µg/L) conforme a absorbância (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5AU) para as amostras de saliva.



Fonte: Dados da pesquisa.

4.7.1 Otimização e validação do método

O método foi otimizado conforme a programação de temperaturas que incluíram as melhores condições para pirólise e atomização. Estas temperaturas foram: 110°C (secagem), 130°C (secagem), 900°C (pirólise: queima da matéria orgânica), 2.300°C (atomização: temperatura que deixa o metal no estado de excitação e possibilita a leitura da absorbância (eixo y) do mesmo) e 2.500°C (limpeza do forno de grafite). A programação adotada após a otimização encontra-se descrita na Tabela 2.

Tabela 2 - Programação das temperaturas para análise de níquel por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite.

Temperatura (°C)	Tempo (s)	Rampa (°C/s)
110	1	30
130	15	30
900	10	20
2300	5	0
2500	3	0

Fonte: Dados da pesquisa.

Após a otimização o método foi devidamente validado. Dentre os parâmetros de validação utilizados, estão o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ). O

limite de detecção refere-se a concentração mínima de níquel que pode ser detectada com uma precisão razoável. Já o limite de quantificação refere-se a menor concentração de níquel que pode ser determinada com precisão e veracidade.

A partir da análise de 10 brancos (cada branco é composto por água ultrapura e solução diluente na concentração utilizada para as amostras de sangue e saliva) e do cálculo dos seus respectivos desvio-padrão (DP); os limites (LD e LQ) foram calculados. A inclinação das retas utilizadas para os cálculos do LD e LQ estão demonstrada nos gráficos 1 e 2, respectivamente.

Quadro 2 – Cálculo do limite de detecção e quantificação para o sangue.

LD = (DPx3)/inclinação da reta	LQ = (DPx10)/inclinação da reta
LD = 0,004551 x 3 ÷ 0,0269	LQ = 0,004551 x 10 ÷ 0,0269
LD = 0,50	LQ = 1,69

Fonte: Dados da pesquisa.

Quadro 3 - Cálculo do limite de detecção e quantificação para a saliva.

LD = (DPx3)/inclinação da reta	LQ = (DPx10)/inclinação da reta
LD = 0,004667 x 3 ÷ 0,0238	LQ = 0,004667 x 10 ÷ 0,0238
LD = 0,58	LQ = 1,96

Fonte: Dados da pesquisa.

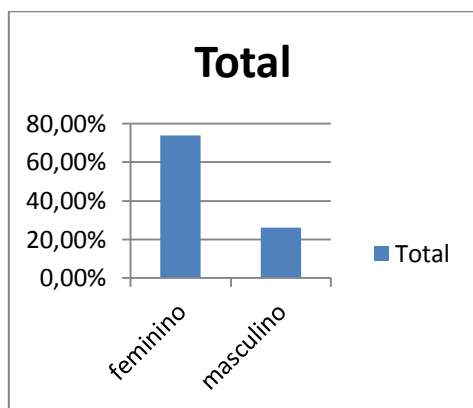
4.8 Análise Estatística dos Resultados

O conjunto de dados das variáveis dependentes não apresentou aderência à distribuição normal, portanto fez-se necessária a utilização de métodos estatísticos não-paramétricos. Os níveis de níquel no sangue e na saliva foram comparados por meio de teste de Wilcoxon – pareado. A correlação entre as concentrações do metal nas amostras de sangue e saliva foi determinada pelo Teste de Correlação de Spearman. Todos os dados foram organizados em planilha eletrônica do software Excel[®] e posteriormente analisados no software SPSS 17 e Action 2.7.

5 RESULTADOS

Participaram deste estudo pacientes atendidos no Ambulatório de Estomatologia do Hospital Universitário da UFSC (HU-UFSC), no período de novembro de 2013 a julho de 2014. A amostra foi composta por um total de 23 pacientes, sendo 10 pacientes não fumantes e 13 fumantes. Destes 13 pacientes, 3 foram diagnosticados com carcinoma de células escamosas bucais (CEC). A distribuição da amostra quanto ao sexo foi de 17 mulheres (73,91%) e 6 homens (26,09%), conforme mostra o Gráfico 3.

Gráfico 3 – Distribuição da amostra quanto ao sexo.



Fonte: Dados da pesquisa.

A média de idade encontrada entre os 23 pacientes foi de $52,43 \pm 8,99$ anos (média \pm desvio padrão). Destes, 9 pacientes (39,13%) tinham idade entre 39-48 anos, 6 pacientes (26,09%) tinham entre 49-58 anos e 8 pacientes (34,78%) tinham entre 59-69 anos.

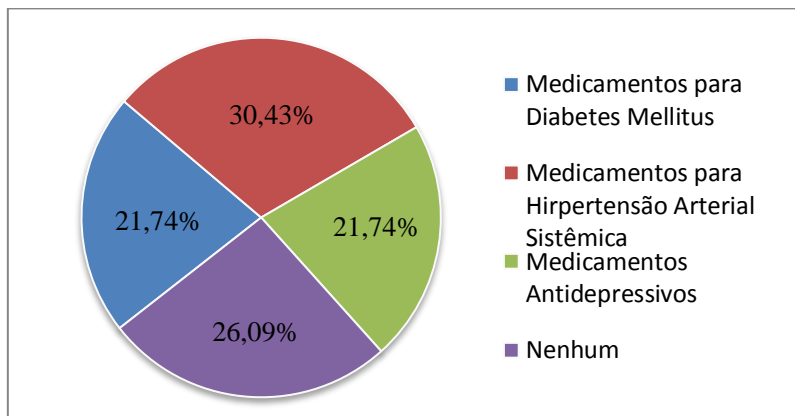
A procedência mais frequente dos pacientes foi da região da Grande Florianópolis. Dos 23 participantes, 19 (82,62%) eram de tal região, 1 (4,35%) de Braço do Norte, 1 (4,35%) de Cocal do Sul, 1 (4,35%) de Imbituba e 1 (4,35%) de Palma Sola.

Dentre os participantes avaliados, 2 ingeriram bebidas alcoólicas diariamente por mais de 20 anos, sendo que um permanece sendo etilista e outro, é ex-etilista há 8 anos.

Quanto às patologias sistêmicas verificadas, foram constatados 5 pacientes (21,74%) com diabetes mellitus e 7 pacientes (30,43%) com hipertensão arterial sistêmica.

Em relação ao uso de medicamentos, 5 pacientes (21,74%) faziam uso de medicamentos para diabetes, 7 (30,43%) para a hipertensão, 5 (21,74%) utilizavam anti-depressivos e os demais não utilizavam nenhum medicamento (26,09%), como demonstrado no gráfico abaixo.

Gráfico 4 - Medicamentos utilizados pelos participantes da pesquisa.



Fonte – Dados da pesquisa.

A coleta da saliva e do sangue foi realizada conforme as tardes de atendimento no Ambulatório de Estomatologia do Hospital Universitário da UFSC (HU-UFSC) ou conforme horário agendado com o paciente. Das 23 coletas de saliva e sangue, 13 (56,52%) foram realizadas no período da tarde e 10 (43,48%) foram no período da manhã.

5.1 Concentrações de níquel nas amostras de saliva e sangue

Os resultados obtidos a respeito da análise salivar e sanguínea estão demonstrados na Tabela 3. Os números 1 ao 23 foram designados para identificação das amostras de cada paciente, sendo do 1 ao 10, pacientes não fumantes, do 11 ao 20, pacientes fumantes e do 21 ao 23, pacientes fumantes com diagnóstico de carcinoma de células escamosas bucais.

Tabela 3 – Concentração salivar e sanguínea de níquel (ug/L) nas amostras coletadas dos participantes.

Amostra	[] Salivar*	[] Sanguínea*
1	4,31	1,71
2	6,35	0,84
3	4,24	0,84
4	12,79	1,85
5	7,81	0,84
6	11,57	0,84
7	24,21	0,84
8	6,99	0,84
9	3,62	0,84
10	0,98	0,84
11	4,17	3,12
12	3,01	4,27
13	3,65	0,84
14	7,18	1,91
15	2,35	2,35
16	3,12	6,66
17	4,31	2,45
18	3,84	0,84
19	5,40	0,84
20	7,98	2,23
21	3,15	0,84
22	3,50	1,78
23	3,44	0,84

*[] Salivar = Concentração (ug/L) de níquel na saliva; [] Sanguínea = Concentração (ug/L) de níquel no sangue.

Fonte: Dados da pesquisa.

Levando em consideração que o limite de quantificação de níquel obtido para a saliva foi de 1,96µg/L, nota-se na Tabela 3, que dos 23 pacientes, apenas 1 apresentou valor abaixo do limite de quantificação. Como isto ocorreu, optou-se por utilizar como padrão metade do valor obtido para o limite de quantificação, ou seja, 0.98ug/L. Já para as amostras

de sangue, sendo o limite de quantificação de níquel 1,69µg/L, dos 23 participantes, 13 apresentaram valores abaixo deste limite. Nestes casos, metade do valor obtido para o limite de quantificação também foi considerado, ou seja, 0,84µg/L.

5.2 Comparação entre os níveis de níquel salivar e sanguíneo

Ao se comparar as concentrações de níquel na saliva e no sangue dos indivíduos participantes da pesquisa, através da utilização do Teste de Wilcoxon – pareado, obteve-se o valor de $p=0,0003$, permitindo-nos afirmar que existe diferença estatisticamente significativa ($p\leq 0,05$). Entretanto, não foi encontrada correlação entre os níveis de níquel na saliva e no sangue (Teste de Spearman, $r=-0,253$ e $p=0,405$).

Os valores mínimo, de média, máximo, desvio-padrão e variância de concentração de níquel estão demonstrados na tabela a seguir (Tabela 4), bem como no Gráfico 5, que demonstra as médias obtidas.

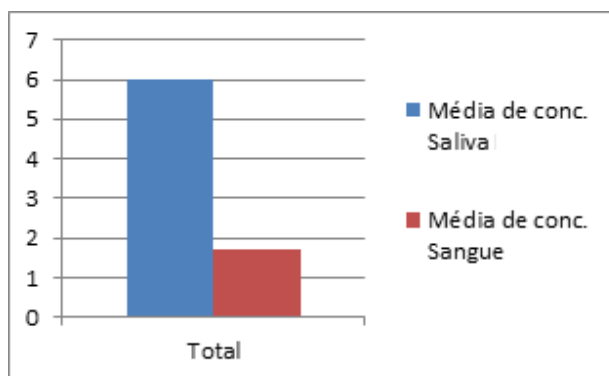
Tabela 4 - Valores mínimo, média, mediana, máximo, desvio padrão e coeficiente de variação das concentrações de níquel encontradas na saliva e no sangue, dados em µg/L.

Amostra	Mínimo	Média	Mediana	Máximo	DP	CV%
Saliva	0,98	5,99	4,24	24,21	4,87	23,79
Sangue	0,84	1,70	0,84	6,66	1,41	2,00

DP – Desvio Padrão; CV% - Coeficiente de Variação.

Fonte – Dados da pesquisa.

Gráfico 5 – Médias das concentrações de níquel na saliva e no sangue (µg/L).



Fonte: Dados da pesquisa.

Devido ao curto período para o desenvolvimento da pesquisa, apenas 3 amostras de pacientes com diagnóstico de carcinoma de células escamosas bucais foram obtidas. Ainda assim foi possível observar a prevalência do sexo masculino nestes. As médias de concentração de níquel na saliva ($3,36\mu\text{g/L}$) e no sangue ($1,15\mu\text{g/L}$) destes três pacientes portadores de CEC bucal ficaram abaixo da média dos demais pacientes não portadores ($6,39\mu\text{g/L}$ para a saliva e $1,87\mu\text{g/L}$ para o sangue).

6 DISCUSSÃO

A exposição crônica aos metais pesados já é reconhecida por aumentar a incidência de câncer nos indivíduos expostos. Além dos diversos outros tipos de câncer, o câncer de boca já foi relatado como consequência a esta exposição ⁽⁹⁵⁻⁹⁹⁾. O presente estudo, por sua vez, visou correlacionar os níveis salivares e sanguíneos de níquel, coletados concomitantemente dos mesmos participantes. Inicialmente, a correlação desses níveis com o diagnóstico de carcinoma de células escamosas bucais também seria realizada, porém, em virtude do número reduzido de pacientes encontrados com esse diagnóstico durante o período das coletas, não foi possível obter nenhuma análise estatística dos mesmos.

Apesar da principal forma de excreção do níquel se dar através da urina ⁽¹⁾, optou-se por utilizar amostras de saliva e sangue para as presentes comparações. A saliva é um bom material para ser analisado, pois ela é suficientemente estável, incolor, de fácil coleta (não invasiva e indolor) e seu transporte e armazenamento podem ser facilmente padronizados ^(100, 101). Segundo Olmedo et al 2010 ⁽⁷³⁾ a análise da saliva complementa a de fluidos corporais clássicos, como o sangue e a urina. Por estes motivos, pretendeu-se verificar se a concentração de níquel na saliva poderia ser um reflexo da concentração do mesmo no sangue.

Ao se comparar os valores obtidos nesta pesquisa, nota-se que os níveis de níquel encontrados na saliva dos participantes foram maiores do que os níveis do sangue (médias de 5,99µg/L e 1,70µg/L, respectivamente). Ainda, ao se observar individualmente cada participante, nota-se que apenas 3 apresentaram níveis salivares menores ou iguais aos sanguíneos, ou seja, na grande maioria das amostras, os participantes tiveram valores maiores de níquel na saliva do que no sangue. Possivelmente os mecanismos de excreção salivar possuem papel nestes valores obtidos, ou seja, a saliva pode ser um meio de excreção importante de níquel a fim de evitar que os níveis deste metal fiquem demasiadamente elevados no sangue. Além disto, não se pode descartar as demais fontes de níquel que poderiam estar presentes na cavidade bucal dos participantes, como restaurações metálicas, próteses com ligas metálicas, piercings e outros; elevando os níveis do metal na saliva.

Dos 23 participantes da pesquisa, dois apresentaram valores de níquel na saliva em concentrações significativamente mais elevadas que os demais (12,79µg/L e 24,21µg/L). No entanto, não foi encontrada nenhuma causa ou alteração específica que pudesse vir a

justificar esses valores. A análise estatística nos permitiu verificar ainda, que mesmo com a exclusão dessas amostras com concentrações mais elevadas, os resultados se comportaram da mesma maneira, ou seja, a concentração de níquel salivar foi estatisticamente maior do que a sanguínea. As ocupações anteriores dos participantes da pesquisa, tais como profissões e serviços diversos, também não interferiram nos resultados, não tendo, portanto, correlação com as concentrações obtidas.

No presente estudo não foi realizada a análise da concentração de níquel na urina dos participantes. No entanto, concomitantemente com os resultados obtidos para a saliva e para o sangue, a urina poderia ter sido útil pela possibilidade de encontrarmos valores semelhantes aos do níquel na saliva, ou seja, valores maiores que os encontrados no sangue. No entanto, cabe aqui ressaltar que este é um estudo inovador por ser um dos primeiros a coletar e correlacionar os níveis salivares e sanguíneos do metal pesado níquel.

Apesar das vantagens da utilização da saliva para as análises, neste estudo não houve correlação entre os níveis salivares e sanguíneos de níquel. Ou seja, a saliva não foi um bom substrato para prever e monitorar os níveis de níquel no sangue. As várias etapas para aquisição das amostras de saliva (coleta, transporte, armazenamento, centrifugação, etc.) são repletas de riscos que podem gerar falhas nos resultados. Todos os cuidados foram tomados como precaução, mas ainda assim, erros podem ter ocorrido. Além disso, existem na literatura poucos estudos que descrevam com precisão a metodologia a ser seguida para a análise do níquel na saliva^(77, 101), sendo utilizada aqui, a descrita por Olmedo et al (2010)⁽⁷³⁾. Por conseguinte, este também é um fator importante a ser considerado ao se interpretar essa falta de correlação encontrada nos resultados.

Comparando-se com estudos anteriores, os níveis de níquel na saliva aqui observados (média de 5,99µg/L) foram maiores que os relatados por Burguera et al. (1998)⁽⁷⁷⁾ (média de 0,81µg/L) e por Cattalanato et al. (1977)⁽⁸⁷⁾ (média de 1,98µg/L). Porém, foram menores que os relatados por Gjerdet et al. (1991)⁽¹⁰²⁾ (média de 8,0µg/L) e por Arikan (1992)⁽¹⁰³⁾ (média de 9,77µg/L). Estes resultados podem refletir as diferentes variáveis que afetam a saliva, como por exemplo, a dieta de cada indivíduo, as condições de saúde e se o paciente estava fazendo uso de algum medicamento que interfira no fluxo salivar naquele período da coleta, o hábito ou não do tabagismo, a exposição ocupacional ao níquel que cada um pode sofrer, o uso ou não de aparelhos ortodônticos, próteses e restaurações com ligas metálicas; a hora do dia em que a coleta foi realizada; dentre outros^(77, 80, 82).

No estudo desenvolvido por Gjerdet et al (1991)⁽¹⁰²⁾, os valores de níquel encontrados na saliva foram mais altos do que os encontrados aqui, como já citado; mas, isto

pode ser justificado pelo fato da análise de Gjerdet ter sido realizada logo após a inserção de aparelhos ortodônticos. O mesmo ocorreu com o estudo de Arikan (1992) ⁽¹⁰³⁾, onde os níveis salivares de níquel foram verificados logo após a inserção de próteses dentárias contendo ligas metálicas.

A dificuldade de produzir saliva presenciada durante a coleta de alguns dos participantes também pode ter interferido nas concentrações de níquel. Muitos fármacos utilizados (cerca de 400) podem causar hipossalivação, como por exemplo os opióides, os anti-histamínicos, antidepressivos, antiepilépticos, ansiolíticos e anticolinérgicos ^(104, 105). Do total de participantes, apenas 5 faziam uso de antidepressivos e a maioria das coletas do presente estudo foi realizada no período da tarde (56,52%), ou seja, exatamente no período em que temos a maior taxa de produção salivar ⁽¹⁰⁶⁾. Todavia, existem outros fatores que podem levar a baixa produção de saliva, como por exemplo, a própria ansiedade gerada pelo paciente no momento da coleta. Cabe ressaltar que neste estudo não conseguimos avaliar o comportamento do níquel frente a situações de hipossalivação e compará-lo com a salivagem normal, não concluindo, portanto, se a hipossalivação leva a uma concentração maior ou menor de níquel na saliva, pois este não era enfoque da pesquisa.

A análise sanguínea, por sua vez, demonstrou uma média de 1,70µg/L de níquel entre os participantes. Esse valor foi maior do que o encontrado por Linden et al. (1985) ⁽⁸³⁾ (média de 0,34µg/L de níquel, em indivíduos não expostos). Como as amostras desta pesquisa incluíram pacientes fumantes (expostos ao níquel), possivelmente esta concentração mais alta de níquel no sangue pode ser justificada devido a esta exposição. Segundo um estudo realizado na Tunísia, a poluição ambiental e o tabagismo podem ser fatores significativos para o aumento da concentração de níquel no sangue dos seres humanos ⁽³⁴⁾. De acordo com Rickert et al (1994) ⁽¹⁰⁷⁾, independente do tipo de cigarro e da sua origem, a concentração de níquel ali presente é alta; ou seja, tudo isso reforça o porquê dos valores mais altos aqui encontrados.

Estudos anteriores demonstram que o cigarro é um fator de risco para o desenvolvimento de câncer ^(9, 10) e que o tabagismo constitui uma importante fonte de exposição crônica a numerosas substâncias, incluindo metais pesados tais como o níquel ⁽¹⁰⁸⁾. Um estudo realizado em Taiwan revelou uma associação significativa entre os níveis sanguíneos de níquel, a prevalência de câncer bucal e o hábito do tabagismo ⁽²¹⁾, sugerindo, portanto, que os níveis de níquel no sangue podem ser maiores em pessoas que fumam e possivelmente, nos que tem CEC. Stojanovic et al. (2004) ⁽¹⁰⁹⁾ também relataram que a concentração de níquel no sangue aumentou em pacientes fumantes e que estes estão sim mais

expostos a substâncias cancerígenas do que os não fumantes, desenvolvendo assim maiores riscos para sua saúde. No presente estudo, por sua vez, a média da concentração de níquel no sangue dos participantes fumantes com diagnóstico de CEC foi de 1,15µg/L. Mesmo este sendo um valor muito semelhante a média dos pacientes não fumantes e sem CEC (média de 1,02µg/L), encontrou-se aqui o que é sugerido pela literatura, ou seja, os pacientes com câncer bucal tiveram níveis maiores de níquel no sangue do que os demais não fumantes e sem câncer. No entanto, para a saliva não se obteve os resultados esperados. Os pacientes fumantes e com câncer bucal tiveram níveis menores (3,36µg/L) de níquel do que os não fumantes e sem CEC (média de 8,28µg/L). Porém, ressalta-se novamente o número pequeno de amostras com CEC aqui obtidas (que não permitiu análises estatísticas) e as tantas variáveis que afetam a saliva.

Sendo assim, observou-se que há uma grande variedade de estudos e uma grande variação entre os indivíduos a respeito das concentrações salivares e sanguíneas de níquel e que diversos fatores podem acarretar mudanças nessas concentrações. Os níveis elevados de níquel na saliva (comparados aos níveis sanguíneos) podem ser justificados por ser a saliva um importante meio de excreção de substâncias para os seres humanos e também pelas demais possíveis exposições da saliva a outras fontes de níquel (além dos cigarros), como o uso de aparelhos ortodônticos, próteses metálicas, restaurações metálicas, etc. No mais, a exposição humana a ambientes altamente poluídos por níquel, bem como a exposição ao níquel que se dá pelo consumo de cigarros, têm o potencial de perturbar a homeostase celular e conduzir a uma variedade de patologias, incluindo o câncer de boca.

7 CONCLUSÕES

No presente estudo concluiu-se que:

- Não foi encontrada correlação entre os níveis de níquel na saliva e no sangue.
- A média da concentração de níquel na saliva foi maior do que a média da concentração de níquel no sangue, podendo este resultado ser consequência de outras fontes de níquel não analisadas nesta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (US.D.H.H). **Toxicological profile for nickel**. Atlanta (Georgia): s.n, 2005.
2. AZEVEDO, F. A., CHASIN, A. **Metais: gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: Atheneu, 2003.
3. CHIANG, CT. et al. **Spatiotemporal trends in oral cancer mortality and potential risks associated with heavy metal content in Taiwan soil**. In: *J Environ Res Public Health*. Ano 2010; n. 7(11), p. 3916-3928.
4. KRIVIAN V, SCHNEIDER G, BAUMANN H, REUS U. Multi-element characterization of tobacco smoke condensate. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 1993;348(3):218-25. Krivan, V. et al. **Multi-element characterization of tobacco smoke condensate. Analytical and Bioanalytical Chemistry**. Academic Genealogy Wiki, 1993. Disponível em: <<http://phdtree.org/pdf/34872276-multi-element-characterization-of-tobacco-smoke-condensate/>>. Acesso: ago. 2014.
5. GOLIA, E.; DIMIRKOU, A.; MITSIOS, I. **Accumulation of metals on tobacco leaves (primings) grown in an agricultural area in relation to soil**. *Bull Environ Contam Toxicol*. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17805940>>. Acesso em: ago. 2014.
6. VIANA, G.; GARCIA, K.; MENEZES-FILHO, JA. **Assessment of carcinogenic heavy metal levels in Brazilian cigarettes**. *Environ Monit Assess*. Bethesta (USA): NCBI/PUB.MED, 2011, p. 255-265. Disponível: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21153763>>. Acesso em: ago. 2014.
7. KASPRZAK, K.; SUNDERMAN, F.; SALNIKOW. K. **Nickel carcinogenesis** (Mutat Res.). Bethesda, 2003, p. 67-97. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14643413>>. Acesso em: ago. 2014.
8. DAS, K.; DAS, S.; DHUNDASI, S. **Nickel, its adverse health effects & oxidative stress**. (Indian J Med Res). Bethesda (USA): 2008, p. 412-425. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Das+KK%2C+Das+SN%2C+Dhundasi+SA.+Nickel%2C+its+adverse+health+effects+%26+oxidative+stress>>. Acesso em: ago. 2014.
9. LIU, Shih-An. **A Literature Analysis of the Risk Factors dor Oral Cancer**. Shanguai (China): InTech China, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/oral-cancer/a-literature-analysis-of-the-risk-factors-for-oral-cancer>>. Acesso em: ago. 2014.
10. RAM, H. et al. **Oral cancer: risk factors and molecular pathogenesis**. *J Maxillofac Oral Surg*. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2011, p. 132-137. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22654364>>. Acesso em: ago. 2014.

11. DENKHAUS, E & SALNIKOW, K. **Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity** (Crit Rev Oncol Hematol). Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2002, p. 35-56. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Denkhaus+E%2C+Salnikow+K.+Nickel+essentiality%2C+toxicity%2C+and+carcinogenicity.+Crit+Rev+Oncol+Hematol>>. Acesso em: ago. 2014.
12. STAVRIDES, J. **Lung carcinogenesis: pivotal role of metals in tobacco smoke. FreeRadicBiol Med.** Bethesda, (USA): NCB/PUB.MED, 2006, p. 1017-1030. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Stavrides+JC.+Lung+carcinogenesis%3A+pivotal+role+of+metals+in+tobacco+smoke.+Free+Radic+Biol+Med.>. Acesso em: set. 2014.
13. BARCELOUX, D. et al. **American Academy of Clinical Toxicology Practice Guidelines on the Treatment of Ethylene Glycol Poisoning.** (Ad Hoc Committee. J Toxicol Clin Toxicol). Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1999, p. 537-560. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Barceloux+DG%2C+Krenzelok+EP%2C+Olson+K%2C+Watson+W.+American+Academy+of+Clinical+Toxicology+Practice+Guidelines+on+the+Treatment+of+Ethylene+Glycol+Poisoning.>>. Acesso em: set. 2014.
14. NIELSEN, F. **Effect of form of iron on the interaction between nickel and iron in rats: growth and blood parameters.** (J Nutr.). Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1980, p. 965-973. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nielsen+FH.+Effect+of+form+of+iron+on+the+interaction+between+nickel+and+iron+in+rats%3A+growth+and+blood+parameters>>. Acesso em: set. 2014.
15. CAPAR, S. & CUNNINGHAM, W. **Element and radionuclide concentrations in food: FDA Total Diet Study 1991-1996.** (J AOAC Int.). Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2000, p. 157-177. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Capar+SG%2C+Cunningham+WC.+Element+and+radionuclide+concentrations+in+food%3A+FDA+Total+Diet+Study>. Acesso em: ago. 2014.
16. AGUILERA, I. et al. **Biomonitoring of urinary metals in a population living in the vicinity of industrial sources: a comparison with the general population of Andalusia, Spain.** (Sci Total Environ.). Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2008, p. 669-678. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Aguilera+I%2C+Daponte+A%2C+Gil+F%2C+Hernandez+AF%2C+Godoy+P%2C+Pla+A%2C+et+al.+Biomonitoring+of+urinary+metals+in+a+population+living+in+the+vicinity+of+industrial+sources%3A+a+comparison+with+the+general+population+of+Andalusia>. Acesso em: set. 2014.
17. SHAKYA PR. **Nickel adsorption by wild type and nickel resistant isolate of chlorella sp.** ISSN, 2007.
18. MOHMOUD LH. **Removal of Iron (II) from Wastewater by locally prepared activated carbon.** Eng. & Tech Journal; 2012.

19. COOGAN, T. et al. **Toxicity and carcinogenicity of nickel compounds.**(Crit Rev Toxicol). Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1989, p.341-384. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2663022>>. Acesso em: set. 2014.
20. CHALOUPKA, F. **Curbing the epidemic: Governments and the economics of tobacco control.** (The World Bank). Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1999, p. 196-201. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1759728/>>. Acesso: ago. 2014.
21. YUAN, T. et al. **Possible association between nickel and chromium and oral cancer: a case-control study in central Taiwan.** (Sci Total Environ). Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2011, p. 1046-1052. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21195455>>. Acesso em: set. 2014.
22. US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (US.D.H.H). **How Tobacco Smoke Causes Disease: The biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General.**Atlanta (Georgia): s. n., 2010.
23. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH.**Respiratory health effects of passive smoking: lung cancer and other disorders.**Washington D.C., 1993.
24. MARTÍN-CAMEÁN, A. et al. **Biomonitorization of chromium, copper, iron, manganese and nickel in scalp hair from orthodontic patients by atomic absorption spectrometry.** Environ Toxicol Pharmacol. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2014, p. 759-771. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mart%C3%ADn-Came%C3%A1n+A%2CMolina-Villalba+I%2CJos+A%2CIglesias-Linares+A%2CSolano+E%2C+Come%C3%A1n+AM%2C+et+al.+Biomonitorization+of+chromium%2C+copper%2C+iron%2C+manganese+and+nickel+in+scalp+hair+from+orthodontic+patients+by+atomic+absorption+spectrometry.+Environ+Toxicol+Pharmacol>. Acesso em: set. 2014.
25. SUNDERMAN, F. et al. **Acute nickel toxicity in electroplating workers who accidentally ingested a solution of nickel sulfate and nickel chloride.** Am J Ind Med. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1988, p.257-266. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sunderman+FW%2C+Dingle+B%2C+Hopfer+SM%2C+Swift+T.+Acute+nickel+toxicity+in+electroplating+workers+who+accidentally+ingested+a+solution+of+nickel+sulfate+and+nickel+chloride>>. Acesso em: set. 2014.
26. ADMANI, S. & JACOB. S. **Allergic contact dermatitis in children: review of the past decade.** Curr Allergy Asthma Rep. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2014, p. 421. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Admani+S%2C+Jacob+SE.+Allergic+contact+dermatitis+in+children%3A+review+of+the+past+decade>. Acesso em: ago. 2014.

27. GUPTA, A. et al. **L-ascorbic acid protects the antioxidant defense system in nickel-exposed albino rat lung tissue.** J Basic Clin Physiol Pharmacol. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2006, p. 87-100. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Gupta+AD%2C+Patil+AM%2C+Ambekar+JG%2C+Das+SN%2C+Dhundasi+SA%2C+Das+KK.+L-ascorbic+acid+protects+the+antioxidant+defense+system+in+nickel-exposed+albino+rat+lung+tissue>>. Acesso em: set. 2014.
28. SUNDERMAN, F. **Sources of exposure and biological effects of nickel.** IARC Sci Publ. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1986, p. 79-92. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sunderman+FW.+Sources+of+exposure+and+biological+effects+of+nickel>. Acesso em: set. 2014.
29. SUNDERMAN, F. et al. **Histopathology of sinonasal and lung cancers in nickel refinery workers.** Ann Clin Lab Sci. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1989, p. 44-50. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sunderman+FW%2C+Morgan+LG%2C+Ander sen+A%2C+Ashley+D%2C+Forouhar+FA.+Histopathology+of+sinonasal+and+lung+cancer+s+in+nickel+refinery+workers>>. Acesso em: ago. 2014.
30. KO, Y. et al. **Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan.** J Oral Pathol Med. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1995, p. 450-453. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ko+YC%2C+Huang+YL%2C+Lee+CH%2C+Chen+MJ%2C+Lin+LM%2C+Tsai+CC.+Betel+quid+chewing%2C+cigarette+smoking+and+alcohol+consumption+related+to+oral+cancer+in+Taiwan>. Acesso em: set. 2014.
31. KARAM-HAGE, M.; CINCIRIPINI, P.; GRITZ, E. **Tobacco use and cessation for cancer survivors: An overview for clinicians.** CA Cancer J Clin. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Karam-Hage+M%2C+Cinciripini+PM%2C+Gritz+ER.+Tobacco+use+and+cessation+for+cancer+survivors%3A+An+overview+for+clinicians>. Acesso em: ago. 2014.
32. SATARUG, S. et al. **Influence of body iron store status and cigarette smoking on cadmium body burden of healthy Thai women and men.** Toxicol Lett. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2004, p.177-85. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Satarug+S%2C+Ujjin+P%2C+Vanavanitkun+Y%2C+Baker+JR%2C+Moore+MR.+Influence+of+body+iron+store+status+and+cigarette+smoking+on+cadmium+body+burden+of+healthy+Thai+women+and+men>. Acesso em: set. 2014.
33. KARITA, K. et al. **Blood lead and erythrocyte protoporphyrin levels in association with smoking and personal hygienic behaviour among lead exposed workers.** Occup Environ Med. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MEDI, 2005, p.300-303. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Karita+K%2C+Nakao+M%2C+Ohwaki+K%2C+Yamanouchi+Y%2C+Nishikitani+M%2C+Nomura+K%2C+et+al.+Blood+lead+and+erythrocyte+protoporphyrin+levels+in+association+with+smoking+and+personal+hygienic+behaviour+among+lead+exposed+workers>.. Acesso em: set. 2014.

34. KHLIFI, R. et al. **Blood nickel and chromium levels in association with smoking and occupational exposure among head and neck cancer patients in Tunisia.** Environ Sci Pollut Res Int. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2013, p. 8282-8294. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Khlifi+R%2C+Olmedo+P%2C+Gil+F%2C+FekiTounsi+M%2C+Chakroun+A%2C+Rebai+A%2C+et+al.+Blood+nickel+and+chromium+levels+in+association+with+smoking+and+occupational+exposure+among+head+and+neck+cancer+patients+in+Tunisia>. Acesso em: ago. 2014.
35. RIVEDAL E, SANNER T. **Metal Salts as Promoters of in Vitro Morphological Transformation of Hamster Embryo Cells Initiated by Benzo(a)pyrene.** Câncer Research. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1981. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Rivedal+E%2C+Sanner+T.+Metal+Salts+as+Promoters+of+in+Vitro+Morphological+Transformation+of+Hamster+Embryo+Cells+Initiated+by+Benzo\(a\)pyrene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Rivedal+E%2C+Sanner+T.+Metal+Salts+as+Promoters+of+in+Vitro+Morphological+Transformation+of+Hamster+Embryo+Cells+Initiated+by+Benzo(a)pyrene). Acesso em: set. 2014.
36. HARTWIG, A. **Current aspects in metal genotoxicity.** Biometals. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1995, p. 3-11. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hartwig+A.+Current+aspects+in+metal+genotoxicity>. Acesso em: ago. 2014.
37. DALLY, H. & HARTWIG, A. **Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells.** Carcinogenesis. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1997, p. 1021-1026. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Dally+H%2C+Hartwig+A.+Induction+and+repair+inhibition+of+oxidative+DNA+damage+by+nickel\(II\)+and+cadmium\(II\)+in+mammalian+cells](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Dally+H%2C+Hartwig+A.+Induction+and+repair+inhibition+of+oxidative+DNA+damage+by+nickel(II)+and+cadmium(II)+in+mammalian+cells). Acesso em: set. 2014.
38. IARC. **Nickel in the human environment.** Proceedings of a joint symposium, Sci Publ. Lyon, France, (53):1-530, 1983.
39. NIELSEN, N. et al. **Effects of repeated skin exposure to low nickel concentrations: a model for allergic contact dermatitis to nickel on the hands.** Br J Dermatol. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1999, p.676-682. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nielsen+NH%2C+Menn%3A+T%2C+Kris+tiansen+J%2C+Christensen+JM%2C+Borg+L%2C+Poulsen+LK.+Effects+of+repeated+skin+exposure+to+low+nickel+concentrations%3A+a+model+for+allergic+contact+dermatitis+to+nickel+on+the+hands>. Acesso em: set. 2014.
40. SUNDERMAN, F. **Mechanisms of nickel carcinogenesis.** Scand J Work Environ Health. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1989, p. 1-12. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2646706>. Acesso em: ago. 2014.
41. PATRIARCA, M.; LYON, T.; FELL, G. **Nickel metabolism in humans investigated with an oral stable isotope.** Am J Clin Nutr. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1997, p. 616-621. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Patriarca+M%2C+Lyon+TD%2C+Fell+GS.+Nickel+metabolism+in+humans+investigated+with+an+oral+stable+isotope>. Acesso em: set. 2014.

42. FULLERTON, A.; ANDERSEN, J.; HOELGAARD, A. MENNÉ T. **Permeation of nickel salts through human skin in vitro**. Contact Dermatitis. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1986, p. 173-177. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Fullerton+A%2C+Andersen+JR%2C+Hoelgaard+A%2C+Menn%C3%A9+T.+Permeation+of+nickel+salts+through+human+skin+in+vitro>. Acesso em: ago. 2014.
43. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). **Toxicological profile for nickel**. Atlanta, GA, USA: ATSDR/U.S. Public Health Service, ATSDR/TP-88/19; 1988.
44. COSTA, M. et al. **Phagocytosis, cellular distribution, and carcinogenic activity of particulate nickel compounds in tissue culture**. Cancer Res. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1981, p. 2868-2876. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Costa+M%2C+Simmons-Hansen+J%2C+Bedrossian+CW%2C+Bonura+J%2C+Caprioli+RM.+Phagocytosis%2C+cellular+distribution%2C+and+carcinogenic+activity+of+particulate+nickel+compounds+in+tissue+culture>. Acesso em: set. 2014.
45. HECK, J. & COSTA, M. **Surface reduction of amorphous NiS particles potentiates their phagocytosis and subsequent induction of morphological transformation in Syrian hamster embryo cells**. Cancer Lett. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1982, p. 19-26. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Heck+JD%2C+Costa+M.+Surface+reduction+of+amorphous+NiS+particles+potentiates+their+phagocytosis+and+subsequent+induction+of+morphological+transformation+in+Syrian+hamster+embryo+cells>. Acesso em: ago. 2014.
46. KUEHN, K.; FRASER, C.; SUNDERMAN, F. **Phagocytosis of particulate nickel compounds by rat peritoneal macrophages in vitro**. Carcinogenesis. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1982, p. 321-326. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kuehn+K%2C+Fraser+CB%2C+Sunderman+F+W.+Phagocytosis+of+particulate+nickel+compounds+by+rat+peritoneal+macrophages+in+vitro>. Acesso em: set. 2014.
47. HECK, J. & COSTA, M. **Surface reduction of amorphous NiS particles potentiates their phagocytosis and subsequent induction of morphological transformation in Syrian hamster embryo cells**. Cancer Lett. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1982, p. 19-26. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Heck+JD%2C+Costa+M.+Surface+reduction+of+amorphous+NiS+particles+potentiates+their+phagocytosis+and+subsequent+induction+of+morphological+transformation+in+Syrian+hamster+embryo+cells>. Acesso em: ago. 2014.
48. REZUKE, W.; KNIGHT, J.; SUNDERMAN, F. **Reference values for nickel concentrations in human tissues and bile**. Am J Ind Med. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1987, p. 419-426. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Rezuke+WN%2C+Knight+JA%2C+Sunderman+FW.+Reference+values+for+nickel+concentrations+in+human+tissues+and+bile>. Acesso em: ago. 2014.

49. HERTEL R; MAS, T.; MUELLER, V. **Environmental health criteria 108: nicke**. In: *International Programme on Chemical safety s*. Genebra (Suíça): World Health Organization, 1991.
50. COSTA M, Zhuang Z, Huang X, Cosentino S, Klein CB, Salnikow K. **Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis**. Sci Total Environ. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1994, p. 191-199. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8029695>>. Acesso em: set. 2014.
51. DAS, K. & DASGUPTA, S. **Effect of nickel on testicular nucleic acid concentrations of rats on protein restriction**. Biol Trace Elem Res. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2000, p. 175-180. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Das+KK%2C+Dasgupta+S.+Effect+of+nickel+on+testicular+nucleic+acid+concentrations+of+rats+on+protein+restriction>. Acesso em: ago. 2014.
52. KASPRZAK, S. **The role of oxidative damage in metal carcinogenicity**. Chem Res Toxicol. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1991, p.604-615. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1807443>. Acesso em: ago. 2014.
53. ZIENOLDDINY, S.; RYBERG, D.; HAUGEN, A. **Induction of microsatellite mutations by oxidative agents in human lung cancer cell lines**. Carcinogenesis. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2000, p.1521-1526. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zienolddiny+S%2C+Ryberg+D%2C+Haugen+A.+Induction+of+microsatellite+mutations+by+oxidative+agents+in+human+lung+cancer+cell+lines>. Acesso em: set. 2014.
54. KLEIN, C.; FRENKEL, K.; COSTA M. **The role of oxidative processes in metal carcinogenesis**. Chem Res Toxicol. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1991, p.592-604. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Klein+CB%2C+Frenkel+K%2C+Costa+M.+The+role+of+oxidative+processes+in+metal+carcinogenesis>. Acesso em: ago. 2014.
55. ROSSETTO, F.; TURNBULL, J.; NIEBOER, E. **Characterization of nickel-induced mutations**. Sci Total Environ. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1994, p.201-206. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8029696>. Acesso em: set. 2014.
56. HIGINBOTHAM, K. et al. **GGT to GTT transversions in codon 12 of the K-ras oncogene in rat renal sarcomas induced with nickel subsulfide or nickel subsulfide/iron are consistent with oxidative damage to DNA**. Cancer Res. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1992, p. 4747-4751. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Higinbotham+KG%2C+Rice+JM%2C+Diwan+BA%2C+Kasprzak+KS%2C+Reed+CD%2C+Perantoni+AO.+GGT+to+GTT+transversions+in+codon+12+of+the+K-ras+oncogene+in+rat+renal+sarcomas+induced+with+nickel+subsulfide+or+nickel+subsulfide+2Firon+are+consistent+with+oxidative+damage+to+DNA>. Acesso em: set. 2014.

57. HARTY et al. **P53 mutations and occupational exposures in a surgical series of lung cancers.** Cancer Epidemiol Biomarkers. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1996, p. 997-1003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=L+C+Harty%2C+D+G+Guinee%2C+Jr+WDT%2C+et+al.+p53+mutations+and+occupational+exposures+in+a+surgical+series+of+lung+cancers>. Acesso em: ago. 2014.
58. KAWANISHI, S.; INOUE, S.; YAMAMOTO, K. **Site-specific DNA damage induced by nickel(II) ion in the presence of hydrogen peroxide.** Carcinogenesis. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1989, p. 2231-2235. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kawanishi+S%2C+Inoue+S%2C+Yamamoto+K.+Site-specific+DNA+damage+induced+by+nickel\(II\)+ion+in+the+presence+of+hydrogen+peroxide](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kawanishi+S%2C+Inoue+S%2C+Yamamoto+K.+Site-specific+DNA+damage+induced+by+nickel(II)+ion+in+the+presence+of+hydrogen+peroxide). Acesso em: set. 2014.
59. SUNDERMAN, F. et al. **Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats.** Ann Clin Lab Sci. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1985, p. 229-236. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sunderman+FW%2C+Marzouk+A%2C+Hooper+SM%2C+Zaharia+O%2C+Reid+MC.+Increased+lipid+peroxidation+in+tissues+of+nickel+chloride-treated+rats>. Acesso em: set. 2014.
60. LEE, Y. et al. **Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation: a new model for epigenetic carcinogens.** Mol Cell Biol. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1995, p. 2547-2557. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lee+YW%2C+Klein+CB%2C+Kargacin+B%2C+Salnikow+K%2C+Kitahara+J%2C+Dowjat+K%2C+et+al.+Carcinogenic+nickel+silences+gene+expression+by+chromatin+condensation+and+DNA+methylation%3A+a+new+model+for+epigenetic+carcinogens>. Acesso em: ago. 2014.
61. BRODAY, L. et al. **Nickel compounds are novel inhibitors of histone H4 acetylation.** Cancer Res. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2000, p. 238-241. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Broday+L%2C+Peng+W%2C+Kuo+MH%2C+Salnikow+K%2C+Zoroddu+M%2C+Costa+M.+Nickel+compounds+are+novel+inhibitors+of+histone+H4+acetylation>. Acesso em: set. 2014.
62. SALNIKOW, K. & WANG, S.; COSTA, M. **Induction of activating transcription factor 1 by nickel and its role as a negative regulator of thrombospondin I gene expression.** Cancer Res. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1997, p. 5060-5066. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Salnikow+K%2C+Wang+S%2C+Costa+M.+Induction+of+activating+transcription+factor+1+by+nickel+and+its+role+as+a+negative+regulator+of+thrombospondin+I+gene+expression>. Acesso em: set. 2014.

63. SALNIKOW, K. et al. **Loss of thrombospondin transcriptional activity in nickel-transformed cells.** Mol Cell Biol. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1994, p. 851-518. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Salnikow+K%2C+Cosentino+S%2C+Klein+C%2C+Costa+M.+Loss+of+thrombospondin+transcriptional+activity+in+nickel-transformed+cells>. Acesso em: ago. 2014.
64. TRAPASSO, F. et al. **Designed FHIT alleles establish that Fhit-induced apoptosis in cancer cells is limited by substrate binding.** Proc Natl Acad Sci U S A. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2003, p. 1592-1597. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Trapasso+F%2C+Krakowiak+A%2C+Cesari+R%2C+Arkles+J%2C+Yendamuri+S%2C+Ishii+H%2C+et+al.+Designed+FHIT+alleles+establish+that+Fhit-induced+apoptosis+in+cancer+cells+is+limited+by+substrate+binding>. Acesso em: ago. 2014.
65. Kowara, R. et al. **Reduced Fhit protein expression in nickel-transformed mouse cells and in nickel-induced murine sarcomas.** Mol Cell Biochem. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2004 p. 195-202. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kowara+R%2C+Salnikow+K%2C+Diwan+B%2C+Bare+RM%2C+Waalkes+MP%2C+Kasprzak+KS.+Reduced+Fhit+protein+expression+in+nickel-transformed+mouse+cells+and+in+nickel-induced+murine+sarcomas>>. Acesso em: set. 2014.
66. SIROVER, M. & LOEB, L. **Infidelity of DNA synthesis in vitro: screening for potential metal mutagens or carcinogens.** Science. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1976, p. 1434-1436. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1006310>>. Acesso em: ago. 2014.
67. HARTWIG A, ASMUS M, BLESSING H, HOFFMANN S, JAHNKE G, KHANDELWAL S, et al. **Interference by toxic metal ions with zinc-dependent proteins involved in maintaining genomic stability.** Food Chem Toxicol. 2002;40(8):1179-84.
68. SCHWERDTLE, T.; SEIDEL, A.; HARTWIG, A. **Effect of soluble and particulate nickel compounds on the formation and repair of stable benzo[a]pyrene DNA adducts in human lung cells.** Carcinogenesis. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2002, p. 47-53. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Schwerdtle+T%2C+Seidel+A%2C+Hartwig+A.+Effect+of+soluble+and+particulate+nickel+compounds+on+the+formation+and+repair+of+stable+benzo%5Ba%5Dpyrene+DNA+adducts+in+human+lung+cells>>. Acesso em: ago. 2014.
69. HARTWIG, A. **Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition.** Toxicol Lett. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1998, p. 235-239. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hartwig+A.+Carcinogenicity+of+metal+compounds%3A+possible+role+of+DNA+repair+inhibition.+Toxicol+Lett>>. Acesso em: set. 2014.

70. IWITZKI F. et al. **Nickel(II) inhibits the repair of O6-methylguanine in mammalian cells.** Arch Toxicol. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1998, p. 681-689. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Iwitzki+F%2C+Schlepegrell+R%2C+Eichhorn+U%2C+Kaina+B%2C+Beyersmann+D%2C+Hartwig+A.+Nickel\(II\)+inhibits+the+repair+of+O6-methylguanine+in+mammalian+cells](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Iwitzki+F%2C+Schlepegrell+R%2C+Eichhorn+U%2C+Kaina+B%2C+Beyersmann+D%2C+Hartwig+A.+Nickel(II)+inhibits+the+repair+of+O6-methylguanine+in+mammalian+cells). Acesso em: ago. 2014.
71. KAWANISHI, S. et al. **Oxidative DNA damage in cultured cells and rat lungs by carcinogenic nickel compounds.** Free Radic Biol Med. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2001, p. 108-116. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kawanishi+S%2C+Inoue+S%2C+Oikawa+S%2C+Yamashita+N%2C+Toyokuni+S%2C+Kawanishi+M%2C+et+al.+Oxidative+DNA+damage+in+cultured+cells+and+rat+lungs+by+carcinogenic+nickel+compounds>. Acesso em: set. 2014.
72. KASPRZAK, K.; KOVATCH, R.; POIRIER, L. **Inhibitory effect of zinc on nickel subsulfide carcinogenesis in Fischer rats.** Toxicology. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1988, p. 253-262. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kasprzak+KS%2C+Kovatch+RM%2C+Poirier+LA.+Inhibitory+effect+of+zinc+on+nickel+subsulfide+carcinogenesis+in+Fischer+rats>. Acesso em: set. 2014.
73. OLMEDO, P. et al. **Validation of a method to quantify chromium, cadmium, manganese, nickel and lead in human whole blood, urine, saliva and hair samples by electrothermal atomic absorption spectrometry.** Anal Chim Acta. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2010, p. 60-67. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Olmedo+P%2C+Pla+A%2C+Hern%C3%A1ndez+AF%2C+L%C3%B3pezGuarnido+O%2C+Rodrigo+L%2C+Gil+F.+Validation+of+a+method+to+quantify+chromium%2C+cadmium%2C+manganese%2C+nickel+and+lead+in+human+whole+blood%2C+urine%2C+saliva+and+hair+samples+by+electrothermal+atomic+absorption+spectrometry>. Acesso em: ago. 2014.
74. GIL, F. & PLA, A. **Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure.** J Appl Toxicol. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2001, p. 245-255. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Gil+F%2C+Pla+A.+Biomarkers+as+biological+indicators+of+xenobiotic+exposure>. Acesso em: ago. 2014.
75. JENSEN, C. et al. **Release of nickel ions from stainless steel alloys used in dental braces and their patch test reactivity in nickel-sensitive individuals.** Contact Dermatitis. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2003, p. 300-304. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jensen+CS%2C+Lisby+S%2C+Baadsgaard+O%2C+Byrialsen+K%2C+Menn%C3%A9+T.+Release+of+nickel+ions+from+stainless+steel+alloys+used+in+dental+braces+and+their+patch+test+reactivity+in+nickel-sensitive+individuals>. Acesso em: set. 2014.

76. BADER, M.; DIETZ, M.; IHRIG, A.; TRIEBIG, G. **Biomonitoring of manganese in blood, urine and axillary hair following low-dose exposure during the manufacture of dry cell batteries.** Int Arch Occup Environ Health. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1999, p. 521-527. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bader+M%2C+Dietz+M%2C+Ihrig+A%2C+Triebig+G.+Biomonitoring+of+manganese+in+blood%2C+urine+and+axillary+hair+following+low-dose+exposure+during+the+manufacture+of+dry+cell+batteries>. Acesso em: ago. 2014.
77. BURGUERA, E. et al. **Determination of nickel in saliva by electrothermal atomic absorption spectrometry using various chemical modifiers with Zeeman-effect background correction.** J Trace Elem Med Biol. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1998, p. 115-120. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Burguera+E%2C+Sanchez+de+Brice%2C+B1o+A%2C+Rondon+CE%2C+Burguera+JL%2C+Burguera+M%2C+Carrero+P.+Determination+of+nickel+in+saliva+by+electrothermal+atomic+absorption+spectrometry+using+various+chemical+modifiers+with+Zeeman-effect+background+correction>. Acesso em: set. 2014.
78. AĞAOĞLU G. et al. **Nickel and chromium levels in the saliva and serum of patients with fixed orthodontic appliances.** Angle Orthod. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2001, p. 375-379. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=A%2C%2Fao%2C%2Fflu+G%2C+Arun+T%2C+Izgi+B%2C+Yarat+A%2C+Izg%2C%2FBC+B.+Nickel+and+chromium+levels+in+the+saliva+and+serum+of+patients+with+fixed+orthodontic+appliances>. Acesso em: set. 2014.
79. WANG, D.; DU, X.; ZHENG, W. **Alteration of saliva and serum concentrations of manganese, copper, zinc, cadmium and lead among career welders.** Toxicol Lett. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2008, p. 40-47. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wang+D%2C+Du+X%2C+Zheng+W.+Alteration+of+saliva+and+serum+concentrations+of+manganese%2C+copper%2C+zinc%2C+cadmium+and+lead+among+career+welders>>. Acesso em: ago. 2014.
80. KOCADERELI L, A. et al. **Salivary nickel and chromium in patients with fixed orthodontic appliances.** Angle Orthod. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2000, p. 431-434. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kocadereli+L%2C+Ata%2C%2F7+PA%2C+Kale+PS%2C+Ozer+D.+Salivary+nickel+and+chromium+in+patients+with+fixed+orthodontic+appliances>. Acesso em: ago. 2014.
81. FORS, R. & PERSSON, M. **Nickel in dental plaque and saliva in patients with and without orthodontic appliances.** Eur J Orthod. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2006, p. 292-297. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Fors+R%2C+Persson+M.+Nickel+in+dental+plaque+and+saliva+in+patients+with+and+without+orthodontic+appliances>. Acesso em: set. 2014.

82. FERGUSON, D. **Current diagnostic uses of saliva.** J Dent Res. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1987, p. 420-424. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ferguson+DB.+Current+diagnostic+uses+of+saliva>. Acesso em: set. 2014.
83. LINDEN, J. et al. **Blood nickel concentrations in patients with stainless-steel hip prostheses.** Ann Clin Lab Sci. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1985, p. 459-464. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Linden+JV%2C+Hopfer+SM%2C+Gossling+HR%2C+Sunderman+FW.+Blood+nickel+concentrations+in+patients+with+stainless-steel+hip+prostheses>. Acesso em: ago. 2014.
84. HOPFER, S.; FAY, W.; SUNDERMAN, F. **Serum nickel concentrations in hemodialysis patients with environmental exposure.** Ann ClinLabSci. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1989, p. 161-167. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hopfer+SM%2C+Fay+WP%2C+Sunderman+FW.+Serum+nickel+concentrations+in+hemodialysis+patients+with+environmental+exposure>. Acesso em: set. 2014.
85. SUNDERMAN, F. et al. **Rapid analysis of nickel in urine by electrothermal atomic absorption spectrophotometry.** Ann Clin Lab Sci. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1986, p. 219-230. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sunderman+FW%2C+Hopfer+SM%2C+Crisostomo+MC%2C+Stoeppler+M.+Rapid+analysis+of+nickel+in+urine+by+electrothermal+atomic+absorption+spectrophotometry>. Acesso em: set. 2014.
86. CHRISTENSEN, O. et al. **Nickel concentration of blood, urine and sweat after oral administration.** Contact Dermatitis. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1979, p. 312-316. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Christensen+OB%2C+M%C3%B6ller+H%2C+Andrasko+L%2C+Lagesson+V.+Nickel+concentration+of+blood%2C+urine+and+sweat+after+oral+administration>. Acesso em: set. 2104.
87. CATALANATTO , F. & SUNDERMAN, F. **Nickel concentrations in human parotid saliva.** Ann ClinLabSci. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1977, p. 146-151. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Catalanatto+FA%2C+Sunderman+FW.+Nickel+concentrations+in+human+parotid+saliva>. Acesso em: ago. 2014.
88. NECHAY, M. & SUNDERMAN, F. **Measurements of nickel in hair by atomic absorption spectrometry.** Ann ClinLabSci. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1973, p. 30-35. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nechay+MW%2C+Sunderman+FW.+Measurements+of+nickel+in+hair+by+atomic+absorption+spectrometry>. Acesso em: ago. 2014.
89. GRANDJEAN, P. et al. **Nickel concentrations in plasma and urine of shipyard workers.** Am J Ind Med. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1980, p. 181-189. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Grandjean+P%2C+Selikoff+IJ%2C+Shen+SK%2C+Sunderman+FW.+Nickel+concentrations+in+plasma+and+urine+of+shipyard+workers>. Acesso em: ago. 2014.

90. TORJUSSEN, W. & ANDERSEN, I. **Nickel concentrations in nasal mucosa, plasma, and urine in active and retired nickel workers.** Ann Clin Lab Sci. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1979, p. 289-298. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Torjussen+W%2C+Andersen+I.+Nickel+concentrations+in+nasal+mucosa%2C+plasma%2C+and+urine+in+active+and+retired+nickel+workers>. Acesso em: ago. 2014.
91. VERSIECK, J. & CORNELIS, R. **Normal levels of trace elements in human blood plasma or serum.** Analytica Chimica Acta. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1980, p. 217-254.
92. KOSEKI, M. et al. **Salivary flow and its relationship to oral signs and symptoms in patients with dry eyes.** Oral Dis. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2004, p. 75-80. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Koseki+M%2C+Maki+Y%2C+Matsukubo+T%2C+Ohashi+Y%2C+Tsubota+K.+Salivary+flow+and+its+relationship+to+oral+signs+and+symptoms+in+patients+with+dry+eyes>. Acesso em: set. 2014.
93. NAVAZESH, M. **Methods for collecting saliva.** Ann N Y Acad Sci. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1993, p. 72-77. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Navazesh+M.+Methods+for+collecting+saliva>. Acesso em: set. 2014.
94. NAVAZESH, M. & KUMAR, S. **Dentistry UoSCSo. Measuring salivary flow: challenges and opportunities.** J AmDent Assoc. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2008, p. 35-40. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Navazesh+M%2C+Kumar+SK%2C+Dentistry+UoSCSo.+Measuring+salivary+flow%3A+challenges+and+opportunities>. Acesso em: ago. 2014.
95. SU, C. et al. **Incidence of oral cancer in relation to nickel and arsenic concentrations in farm soils of patients' residential areas in Taiwan.** BMC Public Health. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2010, p. 10-67. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Su+CC%2C+Lin+YY%2C+Chang+TK%2C+Chiang+CT%2C+Chung+JA%2C+Hsu+YY%2C+et+al.+Incidence+of+oral+cancer+in+relation+to+nickel+and+arsenic+concentrations+in+farm+soils+of+patients'+residential+areas+in+Taiwan>.. Acesso em: set. 2104.
96. SU, C. et al. **Chronic exposure to heavy metals and risk of oral cancer in Taiwanese males.** Oral Oncol. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2010, p. 586-590. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Su+CC%2C+Tsai+KY%2C+Hsu+YY%2C+Lin+YY%2C+Lian+IB.+Chronic+exposure+to+heavy+metals+and+risk+of+oral+cancer+in+Taiwanese+males>. Acesso em: ago. 2014.
97. CHIANG, C. et al. **Elucidating the underlying causes of oral cancer through spatial clustering in high-risk areas of Taiwan with a distinct gender ratio of incidence.** Geospat Health. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2010, p. 230-242. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20503191>. Acesso em: ago. 2014.

98. TISCH, M. & MAIER, H. **Squamous epithelial carcinoma of the tongue after occupational exposure to chromium VI compounds.** Laryngorhinootologie. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1996, p. 455-458. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tisch+M%2C+Maier+H.+%5BSquamous+epithelial+carcinoma+of+the+tongue+after+occupational+exposure+to+chromium+VI+compound%5D>. Acesso em: ago. 2014.
99. TISCH, M.; ENDERLE, G.; ZÖLLER, J.; MAIER, H. **Cancer of the oral cavity in machine workers.** Laryngorhinootologie. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1996, p. 759-763. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tisch+M%2C+Enderle+G%2C+Z%2C+B%2C+Maier+H.+%5BCancer+of+the+oral+cavity+in+machine+workers%5D.+Laryngorhinootologie>. Acesso em: set. 2014.
100. STRANO-ROSSI, S.; COLAMONICI, C.; BOTRÈ, F. **Parallel analysis of stimulants in saliva and urine by gas chromatography/mass spectrometry: perspectives for "in competition" anti-doping analysis.** Anal Chim Acta. 2008;606(2):217-22.
101. MALON, R. et al. **Saliva-Based Biosensors: Noninvasive Monitoring Tool for Clinical Diagnostics.** Biomed Res Int. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Malon+RS%2C+Sadir+S%2C+Balakrishnan+M%2C+C%2C+B%2C+Raoles+EP.+SalivaBased+Biosensors%3A+Noninvasive+Monitoring+Tool+for+Clinical+Diagnostics>. Acesso em: set. 2014.
102. GJERDET, N.; ERICHSEN, E.; REMLO, H.; EVJEN, G. **Nickel and iron in saliva of patients with fixed orthodontic appliances.** Acta Odontol Scand. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1991, p. 73-78. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Gjerdet+NR%2C+Erichsen+ES%2C+Remlo+HE%2C+Evjen+G.+Nickel+and+iron+in+saliva+of+patients+with+fixed+orthodontic+appliances>. Acesso em: ago. 2014.
103. ARIKAN, A. **Effects of nickel-chrome dental alloys used in dentistry on saliva and serum nickel levels, peripheral T-lymphocytes and some other blood parameters.** J Oral Rehabil. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1992, p. 343-352. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Arikan+A.+Effects+of+nickel-chrome+dental+alloys+used+in+dentistry+on+saliva+and+serum+nickel+levels%2C+peripheral+T-lymphocytes+and+some+other+blood+parameters>. Acesso em: set. 2014.
104. COOKE, C.; AHMEDZAI, S.; MAYBERRY, J. **Xerostomia--a review.** Palliat Med. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1996, p. 284-292. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cooke+C%2C+Ahmedzai+S%2C+Mayberry+J.+Xerostomia--a+review>. Acesso em: set. 2014.
105. NEWKIRK, K. et al. **The role of radioactive iodine in salivary gland dysfunction.** Ear Nose Throat J. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2000, p. 460-468. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Newkirk+KA%2C+Ringel+MD%2C+Wartofsky+L%2C+Burman+KD.+The+role+of+radioactive+iodine+in+salivary+gland+dysfunction>. Acesso em: set. 2014.

106. HUMPHREY S. & WILLIAMSON, R. **A review of saliva: normal composition, flow, and function.** *J Prosthet Dent*. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2001, p. 162-169. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Humphrey+SP%2C+Williamson+RT.+A+review+of+saliva%3A+normal+composition%2C+flow%2C+and+function>. Acesso em: ago. 2014.
107. RICKERT WS, KAISERMAN MJ. **Level of lead, cadmium, and mercury in canadian cigarette tobacco as indicators of environmental change: results from a 21-year study (1968-1988).** *Environ Sci Technol*. 1994;28(5):924-7.
108. CARTER, J. et al. **Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent.** *Toxicol Appl Pharmacol*. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 1997, p. 180-188. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Carter+JD%2C+Ghio+AJ%2C+Samet+JM%2C+Devlin+RB.+Cytokine+production+by+human+airway+epithelial+cells+after+exposure+to+an+air+pollution+particle+is+metal-dependent.+Toxicol+Appl+Pharmacol>. Acesso em: ago. 2014.
109. STOJANOVIĆ, D.; NIKIĆ, D.; LAZAREVIĆ, K. **The level of nickel in smoker's blood and urine.** *Cent Eur J Public Health*. Bethesda (USA): NCBI/PUB.MED, 2004, p. 187-189. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Stojanovi%C4%87+D%2C+Niki%C4%87+D%2C+Lazarevi%C4%87+K.+The+level+of+nickel+in+smoker's+blood+and+urine>. Acesso em: set. 2014..

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “**Avaliação dos níveis salivares e sanguíneos de níquel em indivíduos fumantes e portadores de carcinoma de células escamosas bucais – estudo piloto**”, a ser desenvolvida pelas alunas de Odontologia **Georgia Feller** e **Heloísa Krieger**, e pelo **Prof. Dr. Filipe Daniel**.

Objetivos: Avaliar a quantidade de níquel na saliva e sangue de indivíduos fumantes e não fumantes, com e sem câncer de boca.

Justificativa: O cigarro contém vários metais como o níquel. Assim, com este estudo, poderemos estimar a quantidade de níquel absorvida pelo seu corpo e o quanto fica em contato com a mucosa bucal. Como o níquel é uma substância cancerígena, queremos relacionar sua quantidade com a presença ou não do câncer bucal.

Metodologia: Ao participar da pesquisa você será submetido a:

- preenchimento de um questionário com dados pessoais, informações sobre sua doença bucal e sobre o uso ou não cigarro; Poderão ser obtidas informações a partir de seu prontuário hospitalar;
- coleta de sangue: como você será submetido a uma biópsia bucal para determinar o diagnóstico de sua doença, já serão solicitados rotineiramente exames de sangue pré-operatórios. Ao participar desta pesquisa, serão reservados uma quantidade de 5ml de seu sangue para pesquisar a presença de níquel;
- coleta de saliva: você deverá depositar num frasco fornecido pelos pesquisadores toda a saliva que se acumular na sua boca, num período de 5 minutos.

Benefícios: Os benefícios esperados envolvem a produção de conhecimento científico podendo servir de base para outros estudos futuros.

Desconfortos/Riscos: Antes de coletar a saliva e sangue, pediremos que você fique 1 hora sem fumar, o que poderá trazer certo desconforto/ansiedade. A coleta de sangue poderá provocar hematoma/dor/desconforto local, mas é um procedimento que você já irá fazer para permitir a realização da biópsia. A coleta de 5ml de sangue adicional não deverá trazer desconforto adicional. Essa coleta será realizada por profissional capacitado e experiente no Laboratório do HU/UFSC, tomando todos os cuidados para minimizar os riscos. Durante a coleta de saliva, se você se sentir constrangido por estar colocando sua saliva num pote, poderemos deixá-lo sozinho na sala, durante o tempo de coleta. A todo momento iremos tomar os cuidados técnicos e de biossegurança, de modo a minimizar qualquer risco.

Outras informações: O Sr(a) tem a garantia que receberá respostas ou esclarecimentos a todas as suas perguntas sobre os assuntos relacionados ao trabalho, por meio do contato com os pesquisadores, que assumem o compromisso de proporcionar informações atualizadas obtidas durante o estudo. O Sr(a) não terá nenhuma despesa decorrente desta pesquisa, poderá se recusar a responder as perguntas que tragam constrangimento e tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, sem qualquer represália/prejuízo a seu atendimento, através dos telefones (48) **37219473/99571448** (pesquisador), **37219206** (Comitê de Ética em Pesquisa) ou e-mail filipe.daniel@ufsc.br. Os pesquisadores declaram que cumprirão as

exigências contidas na Resolução CNS 466/2012 e que o sigilo dos participantes será garantido durante todas as etapas da pesquisa, inclusive na divulgação dos resultados.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu,....., portador do RG/CPF:..... concordo em participar deste trabalho, bem como com a utilização dos dados coletados, desde que seja mantido o sigilo de minha identificação, conforme normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos. A minha participação é voluntária podendo ser suspensa a qualquer momento. Pelo presente consentimento, declaro que fui esclarecido sobre a pesquisa a ser realizada, de forma detalhada, livre de qualquer constrangimento e obrigação, e que recebi uma cópia deste termo, assinada pelos pesquisadores.

Florianópolis,..... de de 201...

Assinatura do participante

Filipe Ivan Daniel
Pesquisador Principal
(48)37219473/
(48)99571448
Email:filipe.daniel@ufsc.br

Georgia Feller
(48)99620781
Email:gezinha_nt@hotmail.com

Heloísa Krieger
(47)99112913/
(48)99902900
Email:helolinha@hotmail.com

APÊNDICE B – CADASTRO DOS PARTICIPANTES

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO:

Nome: _____
 Sexo: () M () F
 Raça: () Branca () Negra () Amarela () Outra: _____ D.N.: ____/____/____
 Ocupação atual? : _____
 Há quanto tempo trabalha nesta ocupação? _____
 Ocupações anteriores:
 Ocupação 1: _____ de quando até quando? _____
 há quanto tempo não trabalha mais nesta ocupação? _____
 Ocupação 2: _____ de quando até quando? _____
 há quanto tempo não trabalha mais nesta ocupação? _____
 Ocupação 3: _____ de quando até quando? _____
 há quanto tempo não trabalha mais nesta ocupação? _____
 Endereço: _____
 Bairro: _____ Município: _____
 Indústrias próximas à residência ou ao local de trabalho: _____
 Telefones para contato: _____
 Registro Hospitalar: _____

HISTÓRIA MÉDICA PREGRESSA:

Doenças prévias:

Medicamentos em uso:

DIAGNÓSTICO DA LESÃO BUCAL

Diagnóstico clínico: _____
 Diagnóstico histopatológico: _____
 Número do laudo: _____

HÁBITOS:

- () Não fumante
 () Fumante:
 Tempo: _____ anos Quantidade: _____ cigarros/dia (atual)
 () Ex-fumante:
 Parou há _____ anos
 Fumou por _____ anos
 Quantidade: _____ cigarros/dia
 () Convive com fumante(s) em casa/Fica exposto quantas horas/dia ____

- () Não convive fumante(s) em casa
- () Convive com fumante(s) durante o trabalho/Fica exposto quantas horas/dia____
- () Não convive com fumante(s) durante o trabalho
- () Não etilista
- () Etilista - Tempo: _____ anos
- () Ex-etilista: Parou há _____ anos Bebeu por _____ anos

COLETA

*Horário do término do ultimo cigarro fumado:_____

*Horário da coleta:_____

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação dos níveis salivares e sanguíneos de níquel em indivíduos fumantes e portadores de carcinoma de células escamosas bucais - estudo piloto

Pesquisador: FILIPE IVAN DANIEL

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 23649013.5.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 457.387

Data da Relatoria: 25/11/2013

Apresentação do Projeto:

"Avaliação dos níveis salivares e sanguíneos de níquel em indivíduos fumantes e portadores de carcinoma de células escamosas bucais - estudo piloto". Pesquisa observacional transversal que visa analisar, por meio de espectrometria de absorção atômica, a quantidade de níquel presente na saliva e no sangue de 30 indivíduos (fumantes, não fumantes, portadores e não portadores de carcinoma de células escamosas bucais).

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral é avaliar a concentração salivar e sérica de níquel em indivíduos fumantes e portadores de carcinoma de células escamosas bucais e, os específicos

são: a) determinar a concentração de níquel em saliva e sangue periférico por meio da técnica de espectrometria de absorção atômica; b) comparar e relacionar os níveis encontrados na saliva e sangue periférico entre si e com a quantidade de cigarro consumida diariamente; c) correlacionar os resultados obtidos a partir de pacientes portadores de carcinoma de células escamosas bucais com os grupos controle (tabagistas e não tabagistas).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: segundo os pesquisadores poderá haver desconforto do participante quando o mesmo estiver respondendo às perguntas de cunho pessoal durante o questionário. Além disso,

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-900
UF: SC **Município:** FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-0206 **Fax:** (48)3721-0096 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

Continuação do Parecer: 467.307

para a coleta das amostras, será solicitado que o mesmo permaneça sem fumar por pelo menos 1 hora, o que poderá trazer ansiedade e outros desconfortos. Durante a coleta de sangue, os riscos aos quais os pacientes estarão sujeitos são aqueles próprios da técnica de punção venosa como dor, desconforto local, formação de pequeno hematoma e infecção local. Os pesquisadores ressaltam que, como esta coleta será realizada por

profissional habilitado do Laboratório de Análises clínicas do HU/UFSC, todas as medidas preventivas e de biossegurança para minimizar e/ou eliminar estes riscos serão tomadas. Além disso, como este procedimento já é realizado rotineiramente como parte de protocolo pré-cirúrgico do Ambulatório de Estomatologia do HU/UFSC, estes riscos não são adicionais aqueles aos quais os pacientes estariam expostos e que são necessários ao estabelecimento de seu diagnóstico definitivo. Quanto à coleta de saliva, por se tratar de uma técnica não invasiva, não são esperados desconfortos. Entretanto, se houver algum constrangimento durante o período de coleta da saliva, o participante poderá realizar esta etapa isoladamente numa sala reservada, sem a presença de qualquer outra pessoa (inclusive do(s) pesquisador(es)).

Benefícios: os resultados obtidos poderão ser utilizados para confirmar se a saliva se mostra adequada como um substrato para análise da quantidade de níquel absorvida pelo corpo a partir do cigarro. Além disso, também permitirá demonstrar se os níveis mais elevados estão correlacionados com a quantidade de cigarro consumida diariamente e/ou com a presença de câncer de boca. Também, os resultados poderão ser utilizados para inferir se

aqueles indivíduos que apresentem maiores níveis salivares e sanguíneos de níquel apresentam ou não maior risco para o desenvolvimento do câncer bucal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata o presente de um Projeto de Pesquisa do Departamento de Patologia da UFSC que visa estudar, através da técnica de espectrometria de absorção atômica, a quantidade de níquel presente na saliva e no sangue de 30 indivíduos (fumantes, não fumantes, portadores e não portadores de carcinoma de células escamosas bucais). As amostras de tecidos a serem estudadas serão a partir de 30 pacientes atendidos no Ambulatório de Estomatologia do Hospital Universitário da UFSC (HU-UFSC). Projeto bem estruturado com critérios de inclusão e exclusão claros, documentação completa e TCLE adequado aos participantes. Recomendamos a sua aprovação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentação completa.

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-900
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
 Telefone: (48)3721-0206 Fax: (48)3721-0696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 467.367

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FLORIANOPOLIS, 25 de Novembro de 2013

Assinador por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade CEP: 88.040-900
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-0206 Fax: (48)3721-0696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br